

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(S) 00220-1-00000

⑨ 日本国特許庁 (J P)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭64-25800

⑪ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和64年(1989)1月27日

C 07 K 15/12

8318-4H

A 61 K 39/29

7252-4C

C 07 K 7/08

8318-4H※審査請求 未請求 発明の数 11 (全39頁)

⑭ 発明の名称 肝炎Bウイルスヌクレオキャプシド蛋白のT細胞エビトープ

⑮ 特 願 昭62-311803

⑯ 出 願 昭62(1987)12月9日

優先権主張 ⑰ 1986年12月9日 ⑱ 米国 (U S) ⑲ 939617

⑳ 発 明 者 ジョージ ビー ソー アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92127 サン デイ
ントン エゴ マーティナル サークル 11039

㉑ 発 明 者 アン エム モリアー アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サン デイ
テイ エゴ ラドクリフ レーン 3815

㉒ 出 願 人 スクリップス クリニ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92037 ラ ジョラ
ック アンド リサー ノース トーリー バインズ ロード 10666
チ ファウンデーション

㉓ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外4名

最終頁に続く

明細書の浄書
明 細 書

1. 発明の名称 肝炎Bウイルスヌクレオキャ
プシド蛋白のT細胞エビトープ

2. 特許請求の範囲

(1) アミノ酸残基側鎖を介してポリペプチド免疫
原に作用可能に結合したHBcAgを含む免疫原
性ポリペプチド抱合体。

(2) 該HBcAgが粒状形でコア蛋白として存在す
ることを特徴とする特許請求の範囲第(1)項記載
のポリペプチド抱合体。

(3) 上記ポリペプチド免疫原が病原体関連免疫原
であり、かつ上記抱合体が動物に有効量で注入
された際に該病原体と免疫反応する抗体の産生
誘起能を有することを特徴とする特許請求の範
囲第(1)項記載のポリペプチド抱合体。

(4) 上記ポリペプチド免疫原が上記病原体により
誘発された抗体と免疫反応する病原体関連免疫
原である特許請求の範囲第(1)項記載のポリペ
プチド抱合体。

(5) 上記病原体がHBVであり、かつ上記ポリペ

プチド免疫原がHBsAgである特許請求の範囲
第(3)項記載のポリペプチド抱合体。

(6) ペプチド結合により病原体関連免疫原に作用
可能に結合されたHBcAg蛋白を含む免疫原性
融合蛋白。

(7) 上記病原体関連免疫原が該病原体により誘発
された抗体と免疫反応することを特徴とする特
許請求の範囲第(6)項記載の融合蛋白。

(8) 上記病原体関連免疫原が上記HBcAgのアミ
ノ末端をもつアミノ酸残基に作用可能に結合さ
れていることを特徴とする特許請求の範囲第(6)
項記載の融合蛋白。

(9) ペプチド結合により作用可能にアミノ末端を
もつフランキング配列およびカルボキシ末端を
もつフランキング配列に結合した約10~約30
のアミノ酸残基から本質的になるポリペプチド
免疫原を含み、該アミノ末端をもつフランキン
グ配列が、その配列において約位置1から約位
置35までのHBVコア蛋白に対応するアミノ
酸残基配列を有する約10~約20のアミノ酸

残基から本質的になっており、かつ該カルボキシ末端をもつフランキンゲン配列がその配列において約位置10から約位置183までのコア蛋白に対応するアミノ酸残基配列を有する約120～約160のアミノ酸残基から本質的になっていることを特徴とする免疫原性融合蛋白。

- 00 ペプチド結合を介して作用可能にアミノ末端をもつフランキンゲン配列およびカルボキシ末端をもつフランキンゲン配列に結合した約10～約30のアミノ酸残基から本質的になるポリペプチド免疫原を含み、該アミノ末端をもつフランキンゲン配列が約位置1から約位置90までのHBVコア蛋白の配列に対応するアミノ酸残基配列を有する約70～約90個のアミノ酸残基から本質的になり、かつ該カルボキシ末端をもつフランキンゲン配列が位置約80から位置約183までのコア蛋白の配列に対応するアミノ酸残基配列をもつ約65～約85個のアミノ酸残基から本質的になることを特徴とする免疫原性融合蛋白。

- (d) VVSYYVNTNGLKPRQL,
(e) VVSYYVNTNGLK,
(f) LLWPHISCLTFGRBTIVIEYLV,
(g) LLWPHISCLTF,
(h) VSFGVWIRTPPAYRPPNAPIL,
(i) VSFGVWIRTPPA,
(j) PPAYRPPNAPIL, および
(k) WIRTPPAYRPPN.

- 01 HBcAgのアミノ末端から位置約70から位置約140までの該HBcAgのアミノ酸残基配列に対応する配列をもち、ポリペプチド免疫原に作用可能に結合した約15～約70個のアミノ酸残基から本質的になるT細胞刺激ポリペプチドを含む少なくとも20個のアミノ酸残基を含むことを特徴とする複合ポリペプチド免疫原。

- 02 上記T細胞刺激ポリペプチドが、左から右に、かつアミノ末端からカルボキシ末端の方向にみて、以下の式：



で表わされるアミノ酸残基配列をもち、上記の

- 03 コア蛋白のアミノ末端から、位置約70～位置約140のコア蛋白のアミノ酸残基配列の一部に対応する配列をもつ約15～約70個のアミノ酸残基から本質的になる、T細胞刺激ポリペプチド。

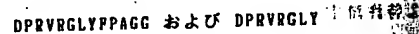
- 04 左から右に、かつアミノ末端からカルボキシ末端の方向にみて、以下に示す式の群から選ばれた式によって表わされるアミノ酸残基配列を含む特許請求の範囲第00項記載のポリペプチド：



- 05 左から右に、かつアミノ末端からカルボキシ末端の方向にみて、以下の式からなる群から選ばれた式で表わされるアミノ酸残基配列から本質的になるT細胞刺激ポリペプチド：



ポリペプチド免疫原が粒状HBsAgおよび左から右に、かつアミノ末端からカルボキシ末端の方向にみて以下の式：



で示されるアミノ酸残基配列から本質的になるより小さなポリペプチドからなる群から選ばれたかつ上記T細胞刺激ポリペプチドがa) アミノ酸残基側鎖を介して上記HBsAgにおよびb) ペプチド結合により上記より小さなポリペプチドに作用可能に結合されていることを特徴とする特許請求の範囲第04項記載の複合免疫原。

- 06 ポリペプチド免疫原をアミノ酸残基側鎖またはペプチド結合を介してHBcAgに作用可能に結合することを特徴とする該免疫原の免疫原性を高める方法。

- 07 HBcAgのアミノ末端側から位置約70～位置約140の該HBcAgのアミノ酸残基配列に対応する配列をもつ約15～約70個のアミノ酸残基から本質的になるT細胞刺激ポリペプチドを、ポリペプチド免疫原に作用可能に結合した

(4) 00872-2000011

ることを特徴とする該免疫原の免疫原性を高める方法。

08 以下の式からなる群から選ばれた一つの式で示されるアミノ酸残基配列をもつT細胞刺激ポリペプチドを、ペプチド結合を介してポリペプチド免疫原に作用可能に結合することを含む該免疫原の免疫原性を高める方法：

- (a) DIDPYKEFGATVELLSFLP,
- (b) RDLDTASALYREALESPHCSPHH,
- (c) TWGVNLEDPASRDLVSVYVNTNMG,
- (d) VVSYYVNTNGLKPRQL,
- (e) VVSYYVNTNGLK,
- (f) LLWPHISCLTFGRRTVIEVLV,
- (g) LLWPHISCLTF,
- (h) VSPGVWIRTTPPAYRPPNAPIL,
- (i) VSPGVWIRTTPA,
- (j) PPAYRPPNAPIL, および
- (k) WIRTTPPAYRPPN.

09 HBVに感染した個体に、HBVコアのアミノ末端側から位置約70～位置約140のHBV

コアのアミノ酸残基配列に対応する配列をもつ約15～約70個のアミノ酸残基から本質的になるT細胞刺激ポリペプチドの有効量を投与することを含む該個体内でHBsAgに対するT細胞応答性を増強する方法。

3. 発明の詳細な説明 (産業上の利用分野)

本発明は、肝炎Bウイルスヌクレオカプシド蛋白(HBcAg)に関連する新規な合成抗原の製造およびワクチン、治療薬などの製造のためのこれら抗原の利用に関するものである。更に詳細には、本発明は、HBcAgT細胞決定基を含むポリペプチド組成物に関する。

(従来の技術)

ランドシュタイナー(Landsteiner)は、1936年に刊行された彼の古典的な研究“血清反応の特異性(The Specificity of Serological Reactions)”において、簡単なアゾ化合物に対する抗体形成が該化合物と免疫原性分子、例えば血清蛋白との結合により誘発し得ることを示した。この簡単なアゾ化合物は単独で注入された場合には抗体形成を誘起しなかったが、アゾ化合物-蛋白複合体を動物に注入した場合には抗-アゾ抗体並びに抗-蛋白抗体の生産が誘発された。小さな非免疫原性分子が担体として大きな免疫原性蛋白分子を用

いるという概念が、かくして開発された。担体と複合化されることにより免疫原性となる分子はハプテンといわれた。

比較的大きな分子がこれに結合している低分子物質の免疫原性を増強する現象は“担体効果”として当分野において公知である。

担体効果は、他の決定基(B細胞決定基)に対する応答を強化する多機能決定基免疫原の一決定基(ヘルパーまたはT細胞決定基)に対する免疫として定義できる。かくして、T細胞は抗原上のヘルパー決定基を認識することにより、B細胞がB細胞特異的抗原に対する抗体を作るのを幾分援助する。更に、今や担体効果はハプテン-蛋白複合体に限られず、例えば蛋白上のサブユニットについてもみられることが立証できる

(ラジュスキー(Rajewsky)等、ジャーナル オブ イクスペリメンタル メディシン(J. Exp. Med.), 1967, 126, 581)。

今や多くの抗原がB細胞の抗体産生を誘発するのにT-細胞の援助を必要とすることが十分に確

証されている。古典的なT細胞援助は抗原ブリッジにより媒介されるT細胞-B細胞直接相互作用を必要とする。ラジュスキー (ジャーナル オブ イクスペリメンタル メディシン (J. Exp. Med.), 1969, 129, 1131) によれば、Tヘルパー細胞 (Th) およびB細胞により認識される抗原決定基は共有結合で結合して単一分子物 (molecular entity) を形成しなければならない。極く最近、いくつかのグループが、T細胞決定基およびB細胞決定基が大きな粒子、例えばウイルスの内容物に存在する際には共有結合は不要であり得ることを示唆した。このT細胞援助の機構は分子間/分子内構造性と呼ばれている。というのは、TおよびB細胞決定基は、共有結合により結合していないが、TおよびB細胞相互作用により作用可能に結合 (これら細胞が、その免疫系が個体のものとみえるような構造にある) している分子上に存在するからである。これについては、ラッセル (Russell) 等、ネイチャー (Nature), 1979, 280, 147; ラム (Lamb) 等、ジ

ャーナル オブ イムノロジー (J. Immunol.), 1982, 129, 1465; シェルレ (Scherle) 等、ジャーナル オブ イクスペリメンタル メディシン (J. Exp. Med.), 1986, 164, 1114; およびレーク (Lake) 等、コールドスプリング ハーバー シンポジウム クオンティタティブ バイオロジー (Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.), 1976, 41, 589を参照のこと。しかしながら、いくつかのものはT細胞なしに抗体産生を誘発し得る。これらは胸腺-独立 (T-独立) 抗原と呼ばれる。全部でなくとも、多くのヘルパーT細胞の不在で作用する抗原は同一の抗原決定基の繰返しサブユニットからなっている。最も一般に使われるT-独立抗原の重合フラジュリン (繰返しサブユニットの蛋白) またはウイルス多糖 (糖の繰返し単位) である。

ハプテン-担体複合体は、免疫応答におけるウイルス細胞の機能を決定する際に現在広く利用されている。しかし、ハプテン-担体複合体は免疫

応答の性質を調べる上で十分に研究固体を援けている。一方で、今だ診断または治療においてそれ程利用されているとはいえない。

最近、病原体関連蛋白は合成ポリペプチドの製造により免疫学的にまねることができることがわかった。該ポリペプチドの配列は該病原体関連蛋白の決定基ドメインの配列に対応する。かかる知見はサットクリフエ (Sutcliffe) 等、ネイチャー (Nature), 1980, 287, 801およびレーナー (Lerner) 等、プロシーディングズ オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 1981, 78, 3403に報告されている。

更に、ゲリン (Gerlin) 等はその文献 (プロシーディングズ オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 1983, 80, 2365) において、HBsAg特に"S" (表面) 領域の残基110-137の決定基部分の配列に対応するアミノ酸残基配列をもつ担体結合合成ポリペプチ

ドで免疫した際に、チンパンジーを肝炎Bウイルスから幾分予防できることを最近示した。しかし、これらの研究で使用した担体蛋白はキーホール立員 (keyhole limpet) ヘモシアニン (KLH) 即ちT細胞依存担体であり、これは著しい炎症をもたらす刺激源であるため、ヒトに使用するには適さない。

当技術では長い間、ヒトにおいて許容されず副作用を生じないポリペプチド免疫原の免疫原性を増強し得るT細胞刺激担体蛋白を研究してきた。免疫原性天然蛋白、特に破傷風トキソイドはヒトに投与するのに適した担体が必要とされる場合に最も頻繁に利用されている。しかし、担体としての破傷風トキソイドの使用さえもその投与量の限界並びに該トキソイド自体に対する感作の危険性のために制限されている。加えて、エビドール特異的抑制が破傷風に對し既に免疫した個体に於いてさえ発生する可能性がある。

高度に免疫原性の担体蛋白を同定する種々の研究努力の結果、デルペイロー (Delpeyroux) 等が

サイエンス (Science), 1986, 233, 472-475 において、ポリオウイルスポリペプチド免疫原用担体としてHBV表面蛋白 (S蛋白) を使用することを報告している。これらの研究者は組換えDNA蛋白表現ビヒクルを作製した。これは真正な2.2nm HBsAg粒子に極めて類似する粒子を形成し得る、HBs Polio Agと名付けられた融合蛋白を生成する。HBs Polio Agは、11個のアミノ酸残基配列インサート (insert) をもつHBVS蛋白からなり、該配列インサートはポリオウイルス タイプ1 (マハニー株 (Mahoney strain)) のカプシド蛋白VP1のアミノ酸93-103に対応する。

デルベロー等は、HBs Polio Agで免疫したマウスの抗血清がポリオウイルス中和抗体の大きな力価をもつことを報告した。しかし、彼等は、また「得られる最良の力価がポリオウイルス標準分だけ低く、力価を改善するための今後の一層の研究が必要である」ことを報告した。

までの該コア蛋白の領域に対応する配列をもつ約15~約70個のアミノ酸残基から本質的になるT細胞刺激ポリペプチドをも目的とする。

また、少なくとも20個のアミノ酸残基をもち、かつコア蛋白のアミノ末端側から位置約70から位置約140までの該コア蛋白のアミノ酸残基配列に相当する配列をもつ約15~約70個のアミノ酸残基から本質的になるT細胞刺激ポリペプチドを含む複合ポリペプチド免疫原も本発明の目的である。このT細胞刺激ポリペプチドは作用可能にポリペプチド免疫原に結合している。

本発明は、またポリペプチド免疫原、好ましくは病原体関連免疫原の免疫原性を高める方法にも係り、該方法はポリペプチド含有HBcAgT細胞エпитープを作用可能に該免疫原に結合することを含む。

A. 定義

“抗体”なる用語は、分子即ち免疫グロブリンと呼ばれる一群のグリコシル化蛋白の一員であり、特異的に抗原に結合し得る分子を意味する。

(発明が解決しようとする問題点およびこれらを解決する手段)

本発明は免疫原性ポリペプチド抱合体を意図するものであり、これはアミノ酸残基側鎖を介してポリペプチド免疫原に作用可能に結合したHBcAg蛋白を含む。好ましい態様においては、該抱合体は病原体関連免疫原、例えばHBsAgに作用可能に結合した粒状コア蛋白を含む。

本発明は、またカルボキシ末端においてペプチド結合によりポリペプチド免疫原、好ましくは病原体関連免疫原、より好ましくはHBsAgに作用可能に結合したHBcAg蛋白を含む免疫原性融合蛋白をも意図する。更に、本発明の融合蛋白はペプチド結合により抗原体関連蛋白に作用可能に結合したHBcAg蛋白を含む。好ましくは、このポリペプチド免疫原のアミノ酸残基はコア蛋白アミノ酸残基の一部、好ましくは同一の数の残基で置換されている。

更に、本発明は該HBVコア蛋白のアミノ酸末端側からアミノ酸残基位置約7から位置約140

“抗原”なる語は古典的には抗体と結合する実在物 (entity) を表すためにおよび抗体の産生を誘発する実在物を表すために使用されていた。より一般的な使用では、抗原の意味を抗体と結合する実在物の意味に限定し、一方“免疫原”なる用語は抗体産生を誘発する実在物に対して使用している。本明細書で議論する実在物が免疫原性でありかつ抗原性である場合には、免疫原と呼ぶか抗原と呼ぶかは典型的にはその意図した用途に応じてなされる。

“抗原決定基”とは抗体結合サイトまたはT細胞レセプタと免疫的に結合した抗原の実際の構造部分を意味する。この用語は“エпитープ”と互換的にも使用される。

ここで使用する“抱合体 (conjugate)”なる用語はアミノ酸残基側鎖を介して作用可能に結合した2またはそれ以上のポリペプチドを表す。

“保存型置換 (conservative substitution)”という本明細書で使用する用語は、一つのアミノ酸残基が他の生物学的に類似の残基で置換された

ことを表す。保存型置換の例は、一つの疎水性残基、例えばイソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニンを別の疎水性のものに置換するか、あるいは一つの極性残基を他の極性残基に置換するものであり、例えばアルギニンとリジンとの間の置換、グルタミン酸とアスパラギン酸との間の置換またはグルタミンとアスパラギンとの間の置換を含む。この“保存型置換”なる用語は、また抗体が未置換アミノ酸を有する対応するポリペプチドとも免疫反応する場合には、未置換親アミノ酸の代りに置換アミノ酸の使用をも包含する。

種々の文法上の形態での、ペプチド配列に関連して使用する“対応する (corresponds)”なる用語は記載されたペプチド配列とアミノ-およびカルボキシ-末端の一方または両者における3個までのアミノ酸残基を意味する。ここでは特にポリペプチド配列に合ったアミノ酸残基の保存型置換のみを含む。

“エпитープ”とは、T細胞抗原レセプタまたは抗体結合サイトと特異的に結合する該当部分を

るHBcAg蛋白である。第1図において、他のサブタイプの配列は当分野で周知である。任意の上記天然HBVスクレオカプシド遺伝子コード蛋白のポリペプチド部分に言及する場合、この言及は、例えば特定の蛋白のT細胞刺激部分を言及していることを述べるか、あるいは含まれるアミノ酸残基の位置を示すなどにより該配列の特定部分を明確に示すことにより明確となる。

様々な形での用語“免疫反応”とはリガンドとしての抗原と抗体結合サイト、例えば全抗体のFab部分を含む分子との間の結合を意味する。

本明細書で用いる“作用可能に (operatively) 結合”とは、該結合が結合したいずれの基も記載のように機能、例えばTまたはB細胞決定基として機能する能力を妨害しないことを意味する。かくして、作用可能に結合しているとは共有結合を含むばかりでなく、分子間/構造間Tヘルプ細胞機能を誘起できる結合をも包含する。

本発明で使用する“病原体関連”とは自然状態にある病原体と免疫反応する抗体の産生を誘起す

意味する。

ここで使用する用語“融合蛋白”とは、通常自然界では一緒に結合しておらず、各末端アミノ酸残基間でペプチド結合により末端間(頭部-尾部)で一緒に作用可能に結合した少なくとも2つのアミノ酸残基配列を表す。本発明の融合蛋白は抗体産生を誘起でき、該抗体はポリペプチドまたは病原体関連免疫原と免疫反応し、該ポリペプチドまたは病原体関連免疫原はアミノ酸残基配列において該融合蛋白の該ポリペプチドまたは病原体関連部分に相当する。

本明細書で使用する“HBcAg”は、肝炎Bウイルススクレオカプシド蛋白遺伝子によりコードされるアミノ酸残基配列に対応するアミノ酸残基配列をもつT細胞刺激蛋白またはポリペプチドを表す。HBVスクレオカプシド遺伝子によりコードされる周知の天然産蛋白の例は“コア蛋白”(第1図に示したようなアミノ酸残基配列をもつ)第1図に示した配列を含む先駆体HBcAg蛋白および第1図に示した配列のポリペプチド部分から

ることのできるポリペプチドを表す。用語“ポリペプチド”および“ペプチド”は本明細書全体を通じて互換性のものとして使用し、かつ隣接アミノ酸の α -アミノ基とカルボキシル基間でペプチド結合により相互に結合された鎖状の一連のアミノ酸を表す。ポリペプチドは種々の長さであり得、中性状態(無電荷)または塩の形であり得、またグリコシル化、側鎖の酸化あるいはホスホリル化などの変性を受けていないか、もまたこれらの変性を含んでいてもよい。当分野では、アミノ酸配列が酸性基および塩基性基を含み、かつ該ペプチドにより示される特定のイオン化状態が、該蛋白が溶液中にある場合取巻いてる媒質のpHに依存し、あるいは該蛋白が固体状態にある場合、これらを得た媒質のpHに依存するとは十分に理解されている。また、付随的にアミノ酸側鎖に付加された置換基、例えばグリコシル単位、脂質あるいは無機イオン、例えば磷酸基によって変性された蛋白並びにスルフヒドリル基の酸化などの、鎖の化学転化に関連する変性も

の定義に含まれる。かくして“ポリペプチド”またはこれに等価な用語は言及される適当なアミノ酸配列を含むことを意図し、機能を損わない上に変性を受けるものと意図される。

“蛋白”なる語は約70またはそれ以上のアミノ酸残基をもつポリペプチドを意味する。

“分泌(secrete)”および“生産(produce)”なる語は、しばしば抗体分子が得られる細胞に関して、当分野では互換性あるものとして使用される。しかしながら、抗体を生産する細胞はこれら分子をその環境中に分泌できない。ここで、該抗体分子は分泌され、血流から得られる(液性抗体)。にも拘らず、当分野で使用されている語句と一致して、抗体は一般に“産生(produced)”されるといわれる。

語句“S(またはpre-S1、pre-S2またはpre-S)領域ポリペプチド(または蛋白)”は、従来通り、対応するアミノ酸残基配列をもつHBsAg蛋白のサブタイプまたはポリペプチドの指定した全領域を示すものとして、ここでも使用する。こ

れら領域のいずれかの部分に言及する場合、この言及は例えばS領域の部分と言及されていることを述べるか、あるいは含まれるアミノ酸残基の位置を示すなどにより、該配列の特定の位置を明確に指示することにより明らかである。

“HBsAgの25キログルトン(kd)ポリペプチド”あるいは“HBsAg25kdポリペプチド”なる表示は、本明細書において、グリコシル化されたもしくはされていない状態にあるS領域のポリペプチドを示すことを意味し、またしばしばp25およびgp28とも言われる。同様に、“HBsAgの33kdポリペプチド”および“HBsAg39kdポリペプチド”とはこれらペプチドのグリコシル化されたもしくはされていない状態のものを示すのに使用され、かつまたp33およびp39とも記される。

B. 免疫原性HBcAg抱合体

本出願人はポリペプチド免疫原を作用可能にHBcAg、特に粒状のHBcAgに結合することにより、驚くべきことに、HBcAgの以前未知であ

ったT細胞依存およびT細胞独立決定基の作用を通して、結合した免疫原の免疫原性が著しく増大することを見出した。かくして、本発明は免疫原性ポリペプチド抱合体を目的とするものであり、該抱合体はアミノ酸残基側鎖を介して作用可能にポリペプチド免疫原に結合したHBcAg蛋白を含む。

該抱合体に存在するHBcAg蛋白は実質的にモノマー形状であり得、好ましい態様ではこれは周知の天然産27nmコア蛋白粒子などの凝集体として存在する。

一般に、HBcAg蛋白および特にpre-コアおよびHBeAg蛋白の製法は当分野で周知である。例えば、27nmの粒子状のコア蛋白(粒状HBcAg)はHBVで慢性的に感染された個体の血液または肝臓から単離できる。例えば、ファイテルソン(Faithelton)等、ジャーナル オブ バイロロジー(J. Virol), 1982, 43, 687-96を参照。更に、HBcAgおよびHBeAgは様々な周知の組換えDNA技術により

生成できる。例えば、イタクラ(itakura)の米国特許第4,356,270号およびムレー(Murray)等の同第4,563,423号を参照。これらの記載を本発明の参考文献とする。

アミノ酸残基側鎖を介して個々のポリペプチドを作用可能に結合して、免疫原性抱合体、即ち分岐鎖ポリペプチドポリマーを形成する方法は当分野で周知である。これらの方法は様々な側鎖上の1以上の型の官能基を介して結合することを含み、かつ共有結合により結合(カップリング)されているが、少なくとも一つの側鎖で分離されている各ポリペプチド骨格を与える。

有用な側鎖官能基は、 α -アミノ基、 β -または γ -カルボキシル基、チオール(-SH)基および芳香族環(例えば、チロシンおよびヒスチジン)を含む。上記官能基の各々を用いてポリペプチドを結合する方法はエアランガー(Erlanger), メソッド オブ エンザイモロジー(Method of Enzymology), 1980, 70, 85; オーラメアス(Aurameas)等、スカンジナビア ジャーナル オ

ブ イムノロジー(Scand. J. Immunol.), 1978, 8, -suppl. 7, 7-23 およびネストール(Nestor)等の米国特許第 4,493,795号に記載されており、これらを本発明の参考文献とする。更に、ロッドウエル(Rodwell)等の論文(バイオテクノロジー(Biotech.), 1985, 3, 889-894)に記載されているようなサイトー指向カップリング反応を実施でき、その結果ポリペプチドの生物学的活性は殆ど減じられることはない。

更に、当分野で周知の如く、H B c Ag蛋白およびポリペプチド免疫原両者はその自然の形状で使用でき、あるいはその官能基含量はリジン残基のサクシニル化またはシステイン-チオラクトンとの反応により変えることができる。また、スルフヒドリル基も、アミノ基と2-イミノチオランまたは3-(3-ジチオピリジル)プロピオネートのN-ヒドロキシサクシニミドエステルとの反応によりいずれかのポリペプチドに組込むことができる。これらのポリペプチドは、またスペースアーム、例えばヘキサメチレンジアミンまたは小

さな寸法の他の2官能性分子を組込んで変性し、結合を容易にすることができる。

任意のポリペプチド免疫原(これに対して抗体産生が望まれる)はH B c Ag蛋白に結合して本発明の免疫原性抱合体を形成することができる。好ましい態様において、このポリペプチド免疫原は病原体関連免疫原であり、かつ該抱合体は、動物に有効量で注入した場合に該病原体と免疫反応する抗体産生を誘発する能力をもつ。特に重要な免疫原の例はバクテリア、例えばB. ペルツシス(B. pertussis)、S. タイボーズ(S. typhosa)、S. パラチフォイド(S. paratyphoid)、AおよびB. C. ジフテリアエ(C. diphtheriae)、C. テタニ(C. tetani)、C. ボツリヌム(C. botulinum)、C. パーフリンジエンス(C. perfringens)、B. アンスラシス(B. anthracis)、P. ペスチス(P. pestis)、P. マルトシダ(P. multocida)、V. コレラエ(V. cholerae)、N. メニンジタイデス(N. meningitidis)、N. ゴノレア(N. gonorrhea)、

インフルエンザエ(H. influenzae)、I. パラジウム(I. palladium)などから得られる免疫原；ウイルス、例えばポリオウイルス、アデノウイルス、パラインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、RSウイルス、インフルエンザウイルス、馬脳脊髄炎ウイルス、豚コレラウイルス、ニューカッスルウイルス、鶏痘ウイルス、狂犬病ウイルス、ネコおよび犬ジステンパーウイルス、口蹄疫ウイルス、ヒトおよび猿免疫不全症ウイルスなどを由来とする免疫原；リケッチャ免疫原、例えば流行性および風土病性チフスおよび斑点熱病群などである。免疫原は従来から周知であり、様々な文献、例えば米国特許第 3,149,036号、同第 3,983,228号および同第 4,069,313号；ロイド(Roit)によるエッセンシャル イムノロジー(Essential Immunology)、第3版、ブラックウェルサイエンティフィック出版(Blackwell Scientific Publication)；ファンダメンタルズオブ クリニカル イムノロジー(Fundamentals of Clinical Immunology)、アレキサンダー&グ

ッフ(Alexander & Goud)著、W. B. サンダース(Saunders)刊；およびイムノロジー(Immunology)ペランチ(Bellanti)著、W. B. サンダース(Saunders)刊に記載されている。特に好ましい病原体関連免疫原は米国特許第4,625,015号、同第4,544,500号、同第4,545,931号、同第4,663,436号、同第4,631,191号および同第4,629,783号並びにPCT国際公開第WO 87/02775号および同第WO 87/02892号に記載されているものである。これらを本発明の参考文献とする。

免疫した動物からの体サンプル中にある免疫原に対する抗体の存在を測定する方法は当分野で周知である。

好ましい態様において、ポリペプチド免疫原は病原体関連免疫原であり、これは該病原体により誘発された抗体と免疫反応、即ちこれに免疫的に結合する。より好ましくは、この病原体関連免疫原は該病原体による感染に対する防御を与える抗体応答を誘起できる。交叉反応性および防御原の存在を測定する方法は当分野において周知

(Of) 00852-10000000

る。好ましい態様において、病原体関連ポリペプチド免疫原は肝炎Bウイルス表面抗原(HBsAg)である。ここで使用するHBsAgとは天然産フィラメント状および球状22nm粒子、個々の主ポリペプチドおよび該粒子を含有するそのグリコシル化体(粒子は例えばp25/sp28、p39/sp42およびsp33/sp36)およびアミノ酸配列において個々のタンパクおよび糖蛋白部分に対応する合成ポリペプチドをいう。

かくして、一態様において、病原体関連免疫原はフィラメント状または球状HBsAgである。もう一つの態様では、該病原体関連免疫原は33kd HBsAg蛋白または25kd HBsAg蛋白である。別の態様では、ポリペプチド免疫原は、アミノ末端位とカルボキシ末端位との間に位置するHBsAgのpre-S領域の一部、夫々1-21、16-27、32-53、53-74、94-105、94-117、106-117、120-140、120-145、128-138、133-139、

p p 57-70、アカデミックプレス: adw-バセック(Pasek)等、ネイチャー(Nature)、1979、282、575、およびadw-フジヤマ(Fujiyama)等、ヌクレックアシズリサーチ(Nucl. Acids Res.)、1983、11、4601。

更に別の態様において、ポリペプチド免疫原はアミノ末端とカルボキシ末端位間に位置するHBsAgのS領域の部分、夫々110-137、117-137、122-137および135-155からなる群から選ばれる部分に対応する。このHBsAgのS領域のアミノ酸残基配列は第3図に示した。ここで、その他のHBVサブタイプのヌクレオチド配列決定はバセック(Pasek)等、ネイチャー(Nature)、1979、282、575; バレンツェラ(Valenzuela)等、ネイチャー(Nature)、1979、280、815-819; およびガリバート(Galibert)等、ネイチャー(Nature)、1979、281、646-650にみられる。

以下、ポリペプチド免疫原の調製法を記載する。

133-140、133-143、133-145、135-143、135-145、137-143、133-151および153-171からなる群から選ばれる部分に対応する合成ポリペプチドである。HBsAgのpre-S領域のアミノ酸残基配列は第2図に示されている。第2図において、追加の残基のラインは6個全てのサブタイプにおいて相同である残基を表す。残基上方の数値はアミノ末端からの配列位置を表し、各10番目の数値は通常の水平位置ではなく垂直位置に与えられている。サブタイプに対する配列は以下のように報告されている。sym- ガリバート(galibert)等、ネイチャー(Nature)、1979、281、646; adw / adr-オノ(Ono)等、ヌクレックアシズリサーチ(Nucl. acids Res.)、1983、11、1747; adw-バレンツェラ(Valenzuela)等、ICN-UCLAシンポジウム アニマル ウイルス ジェネティクス(ICN-UCLA Symposia on Animal Virus Genetics)、フィールズ(Fields)等編、1908、

C. HBcAg融合蛋白

本出願人により見出された粒状HBVコア蛋白の予想外に強力な免疫原性は、そのT細胞独立およびT細胞依存特性の間の相乗効果の結果であると思われる。

前に議論したように、T細胞独立性は比較的高分子量の分子上に表現されている適度に隔置されたハプテンまたはエピトープ、即ち同一の決定基の繰返しアレイがしきい値となる数で存在する結果として生ずることを当技術は示唆している。かくして、本発明は粒状コア蛋白(さもなくばT細胞依存性ポリペプチド免疫を提供してしまう)に固有の繰返し分子構造を、T細胞独立様式で、即ちT細胞独立アレイで有利に利用することを意図する。

融合蛋白は、T細胞独立アレイ中におけるポリペプチド免疫原を示す目的を達成するのに特に適している。かくして、本発明はポリペプチド免疫原好ましくは病原体関連免疫原をもつHBVコア蛋白を含む融合蛋白を意図しており、該免疫原は

通常天然コア蛋白中で隣接しているアミノ酸残基間に挿入されて、該ポリペプチド免疫原は、該融合蛋白が配列された凝集体または粒子を形成する場合に、T細胞独立アレイ中で表現される。好ましくは、ポリペプチド免疫原を形成するアミノ酸残基は、22nmコア粒子の表面に存在することが知られているコア蛋白アミノ酸残基の同等な数で置換されている。

蛋白または蛋白粒子上に存在するアミノ酸残基配列の存在を決定する方法は公知である。これらの方法は、アミノ酸残基配列の点で上記蛋白の一部に対応するペプチドにより誘発される抗体が天然形(完全な)にある蛋白粒子と免疫反応するかどうかを決定することを含む。この方法を用いて、位置約14~約35および位置約73~87のアミノ酸残基配列が天然コア粒子表面上に存在することがわかった。融合蛋白中とこれら領域に挿入または代入されたポリペプチドは、従ってT細胞独立アレイ中の該融合蛋白により形成する粒子の表面上に存在している。

配列およびカルボキシ末端をもつフランキング配列に作用可能に結合した約10~約30個のアミノ酸残基から本質的になるポリペプチド免疫原を含む。このアミノ末端をもつ配列は、配列においてコア蛋白の位置約1~約90に対応するアミノ酸配列をもつ約70~約90個のアミノ酸残基から本質的になる。該カルボキシ末端をもつフランキング配列は、配列においてコア蛋白の位置約80~約183に対応するアミノ酸残基配列をもつ約65~約85個のアミノ酸残基から本質的になる。

もう一つの態様において、本発明は免疫原性融合蛋白をも目的とし、これはペプチド結合により病原体関連免疫原、好ましくは該病原体により誘発された抗体と免疫反応する免疫原と作用可能に結合したHBcAg蛋白を含む。

好ましい態様において、免疫原性融合蛋白は、ペプチド結合により、アミノ酸残基配列に作用可能に結合したHBVコア蛋白を含み、該配列はHBsAg(このアミノ酸残基配列は第2図に示さ

かくして、好ましい態様において、本発明の免疫原性融合蛋白はペプチド結合によりアミノ末端をもつフランキング配列およびカルボキシ末端をもつフランキング配列に作用可能に結合した約10~約30アミノ酸残基から本質的になるポリペプチド免疫原を含む。このアミノ末端をもつフランキング配列は、配列においてコア蛋白の位置約1から約35に対応するアミノ酸残基配列をもつ約10~約20個のアミノ酸残基から本質的になる。上記カルボキシ末端をもつフランキング配列は、配列において位置約10~約183のコア蛋白に対応するアミノ酸残基配列をもつ約120~約160個のアミノ酸残基から本質的になる。好ましくは、該アミノ末端をもつフランキング配列は、配列においてコア蛋白の位置約1~約25に対応し、かつ該カルボキシ末端をもつフランキング配列は、配列においてコア蛋白の位置約30~約183に対応する。

本発明は免疫原性融合蛋白にも関り、これはペプチド結合によりアミノ末端をもつフランキン

グ配列(このアミノ酸残基配列は第2図に示されている)のpre-S領域部分に対応する。コア蛋白が、第3図に示されたアミノ酸残基配列を6つのHBsAgのS領域部分に結合している態様も好ましい。

更に別の態様において、本発明は免疫原性融合蛋白を意図しており、これはカルボキシ末端において、ペプチド結合によりポリペプチド免疫原、好ましくは病原体関連免疫原に作用可能に結合したHBcAgを含んでいる。

本発明の免疫原性融合蛋白は周知の組織文化技術を用いて生成できる。pre-コア、コアおよびHBcAg蛋白をコードするDNA配列は公知である。同様に、多くのポリペプチド免疫原および病原体関連免疫原のDNA配列が公知である。HBcAg蛋白をコードするDNA配列は、変異ヒクルに挿入されかつ適当な宿主中に本発明の融合蛋白として表現される。ポリペプチド免疫原または病原体関連免疫原をコードする1またはそれ以上のDNA配列に適宜結合できる。

本発明の融合蛋白を生成するのに使用して

(57) 00000-1000000000

DNA配列を遺伝的に操作する技術を記載する例は以下のものに見出せる。即ち、ガリバート (Gallibert) 等の米国特許第 4,428,941号; コーエン (Cohen) 等の同第 4,237,224号; マニス (Manis) の同第 4,273,875号; リッグス (Riggs) の同第 4,431,739号; グッドマン (Goodman) 等の同第 4,363,877号およびロドリゲス & タイト (Rodriguez & Tait)、リコンビナントDNAテクニック: アン イントロダクション (Recombinant DNA Techniques: An Introduction)、ベンジャミン・クミングス社 (The Benjamin-Cummings Publishing Co., Inc.)、メンロパーク (Menlo Park) CA, 1983。これらを本発明の参考文献とする。その他の利用できる組換えDNA技術は以下で議論する。

D. T細胞刺激ポリペプチド

以下に記載する研究では、T細胞刺激エピートプを含むHBVコア蛋白の2つの領域を同定した。これらの領域は、第1図に示したayw サブタイプコア蛋白のアミノ末端から位置約1~約25および

約70~約140のアミノ酸残基に対応する。HBVコア蛋白領域1-44および70-140はT細胞活性化を抑制する決定基を含まないものと思われる。

かくして、本発明はT細胞刺激ポリペプチドを目的とし、これはHBVコア蛋白のそのアミノ末端から位置約1~約55のアミノ酸残基配列に対応する配列をもつ約15~約55個のアミノ酸残基から本質的になる。以下の第1表にアミノ酸残基配列が示されているポリペプチドp1-20およびp28-52は好ましいポリペプチドであり、これは上記コア蛋白の上記領域部分に対応する。

第1表: 合成ポリペプチド

| ペプチド名称 | アミノ酸残基配列 |
|------------|----------------------------|
| p1 - 20 | MDIDPYKEFGATVELLSFLP |
| p28 - 52 | BDLLDTASALYREALESPHCSPPH |
| p70 - 94 | TMVGVLNLEDPASRDLVVSVVNTNMG |
| p85 - 100 | VVSYYVNTNMGKPRQL |
| p85 - 96 | VVSYYVNTNMGK |
| p100 - 120 | LLWPHISCLTFGBRETVIEWLV |
| p100 - 110 | LLWPHISCLTF |
| p120 - 140 | VSPGVNIRTPPAYRPPNAPIL |
| p120 - 131 | VSPGVNIRTPPA |
| p129 - 140 | PPAYRPPNAPIL |
| p125 - 136 | WIRTPPAYRPPN |

ここで同定した全アミノ酸残基は天然またはL-構造にある。標準ポリペプチド命名法 (ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.), 1969, 243, 3557-59) に一致して、アミノ酸残基の略号は以下の対応表に示されている通りである。

対 応 表

| 記 号 | | アミノ酸 |
|------|------|---------------|
| 1-文字 | 3-文字 | |
| Y | Tyr | L-チロシン |
| G | Gly | グリシン |
| F | Phe | L-フェニルアラニン |
| M | Met | L-メチオニン |
| A | Ala | L-アラニン |
| S | Ser | L-セリン |
| I | Ile | L-イソロイシン |
| L | Leu | L-ロイシン |
| T | Thr | L-スレオニン |
| V | Val | L-バリン |
| P | Pro | L-プロリン |
| K | Lys | L-リジン |
| H | His | L-ヒスチジン |
| Q | Gln | L-グルタミン |
| E | Glu | L-グルタミン酸 |
| Z | Glx | L-グルタミン酸 または |
| | | L-グルタミン |
| W | Trp | L-トリプトファン |
| R | Arg | L-アルギニン |
| D | Asp | L-アスパラギン酸 |
| N | Asn | L-アスパラギン |
| B | Asx | L-アスパラギン酸 または |
| | | L-アスパラギン |
| C | Cys | L-システイン |

もう一つの態様において、T細胞刺激ポリペプチドは、HBVコア蛋白のアミノ末端からその位置約70~約140のアミノ酸残基配列に対応す

る配列をもつ約15〜約70個のアミノ酸残基から本質的になる。

上記第1表に示されたアミノ酸残基配列をもつポリペプチド p70-94、p85-100、p85-96、p100-120、p100-110、p120-140、p120-131、p125-136およびp129-140は好ましいポリペプチドであり、これらは上記コア蛋白の上記領域に対応する。

本発明のT細胞刺激ポリペプチドは天然産HBVコアおよびHBcAg蛋白により表現されるT細胞エпитープに対応する。結果的に、これらポリペプチドは他の免疫原に作用可能に結合でき、かつ該免疫原と免疫反応する抗体産生を増強するために使用できる。

前に議論したように、結合は様々な方法で形成できる。特に有用なのは多数の複素二官能性試薬であり、これらは一つの官能基末端にジスルフィド結合および他端にペプチド結合を生じ、N-サクシジミジル-3-(2-ピリジルジチオ)-

ロビオネート (SPDP) を含む。この試薬はそれ自身と一方の蛋白におけるシステイン残基との間にジスルフィド結合を形成し、かつ他方の蛋白中のリジンまたは他の遊離アミノ基上のアミノを介してアミド結合を形成する。様々なかかるジスルフィド/アミド形成剤は公知である。例えば、イムノロジーレビュー (Immun. Rev.), 1982, 62, 185を参照のこと。他の二官能性カップリング剤はジスルフィド結合よりもむしろチオエーテルを形成する。多数のこれらのチオエーテル形成剤が市場で入手でき、6-マレイミドカプロン酸、2-ブロモ酢酸、2-ヨード酢酸、(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサノールカルボン酸などの反応性エステル類を含む。カルボキシ基はこれらをサクシニミドまたはヒドロキシ-2-ニトロ-4-スルホン酸、リウム塩と結合することにより活性化される。本発明の方法に特に好ましいカップリング剤はサクシニミジル4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサノールカルボキシレート (S.M.C.)

(ロックフォード (Rockford)、IIIのピアース社 (Pierce Company) から得られる) である。上記例示で全部ではなく、例示化合物の変性体も明らかに使用できる。

本出願人は、HBcAg-特異的T細胞エпитープが、たとえHBcAg-特異的T細胞サイトおよびエンペローブ-特異的B細胞エпитープが、同一の粒子内の異なる分子上に存在していたとしても、エンペローブ-特異的B細胞クローン生成抗体を“援助”できる。従って、人為的粒子内の複数の合成T細胞サイトの包括は、多数のT細胞ヘルパ決定基を密集させる良好な方法となり、これらの決定基は同一粒子内に存在する任意のB細胞エпитープに対するTh細胞の抗体産生を誘起するべく機能する。このことは多数のT細胞およびB細胞エピトープの共有結合の必要性を排除する。

かくして、本発明のT細胞刺激ポリペプチドと対象とする病原体関連ポリペプチドとを作用可能に結合するもう一つの方法は人為的な粒子構造、例えばリボゾームおよびISCOM (免疫刺激複

合体) などの内部への包括を含む。ワクチンの有効成分を放出するビヒクルとしてリボゾーム (Ribosome) 及びISCOMの使用は当分野で公知であり、その調製も同様である。例えば、リボゾーム調製についてはグレゴリアディス (Gregoriadis) 及びバイオテクノロジー (Trends Biotech.), 1982, 3, 235-241およびノース (North) 及びロシーディングス オブ ナチュラル センチネルズ (North & Roschewsky, eds., Natl. Acad. Sci. USA), 1982, 79, 7504-08を、またISCOM調製についてはモライン (Morein) 等、ネイチャー (Nature), 1987, 308, 457-460およびダルスガード (Dalsgaard), アーカイブス・ウイルスforsch.), 1974, 44, 271-281を参照。かくして、本発明のリボゾームISCOMは、有効成分として、本発明のT細胞刺激ポリペプチド、好ましくは第1表のポリペプチド、および病原体関連ポリペプチド、好ましくは第2表の

より好ましくはHBsAgポリペプチドp133-140を含む。他の好ましい病原体関連ポリペプチドはドリーズマン (Dreesman) 等のネイチャー (Nature), 1982, 295, 158-160に記載の型状HBsAgペプチド、即ち位置121のcys₁がserにより置換されたHBsAgペプチドp117-137および位置122におけるarg₁がlysにより置換されたp122-137である。

本発明のT細胞刺激性ポリペプチドは多数の従来の方法で調製できる。これらは短い配列であるので、これらは標準的な手段を用いて別々の物質としてあるいはポリペプチド免疫原と端部間結合されたものとして、化学的な合成により調製できる。

特に有利なのは固相法である (例えば、エリクソン (Erikson, B.W.) 等、ザプロテインズ (The Proteins), 1976, 第2巻, p255, アカデミックプレス、ニューヨーク参照)。事実、自動固相合成装置は市販品として入手できる。これを使用するのに必要な試薬も同様である。かく

して、HBVコア蛋白の1-20、28-52および70-140領域のアミノ酸配列を模倣でき、かつ該配列における変更も、適当な残基の置換、付加または省略により容易に行うことができる。上記のような変更の特に有利なものは、カルボキシ末端にシステイン残基を付加して、ポリペプチド免疫原に対して有利な結合用のスルフヒドリル基を与えることを含む。更に、スパーサエレメント、例えば追加のグリシン残基を、該配列のC-末端における結合アミノ酸と該ペプチドの残部との間に組込むことができる。

また、所定の配列が比較的短いので、単独またはポリペプチド免疫原アミノ酸残基配列との組合せで、これらのペプチドを生成する組換え技術は特に有用である。前に議論したように、HBcAgおよび種々のポリペプチド免疫原をコードするDNA配列は当分野で公知である。本発明で意図する長さのペプチドに対するコード配列は、例えばマチューシ、M. (Matteucci, M.) 等によるホスホトリエステル法 (ジャーナル オブ アメリ

カン ケミカル ソサイエティー (J. Am. Chem. Soc.), 1981, 103, 3185) などの化学的方法で簡単に合成できる。勿論、コード配列を化学的に合成することにより、任意の所定の変更が、単に適当な塩基を元のペプチド配列をコードする塩基と変えることにより行うことができる。従って、このコード配列は適当なリンカーを備えることができ、かつ今や一般に当分野で入手できる表現ベクタおよび適当な宿主を形質転換するのに用いる調節ベクタに接合して所定の蛋白を作製できる。

多数のかかるベクタおよび適当な宿主系が今では入手できる。例えば、バクテリア宿主と適合性のプロモータ配列が、有利な制限サイトを含むプラスミド中に所定のコード配列の挿入のために準備されている。かかるベクタプラスミドの典型例は、例えばpUC8、およびメッシング、J. (Messing, J.) (ミネソタ大学; 例えばメッシング等のスクレイック アシックス リサーチ (Nucleic Acids Res.), 1981, 9, 309参照) から

入手できるpUC13; またはニューイングランド バイオラプス (New England Biolabs) から入手できるpBR322である。適当なプロモータは、例えば β -ラクタマーゼ (ベニシリナーゼ) およびラクトース (lac) プロモータ系 (チャン (Chang) 等、ネイチャー (Nature), 1977, 198, 1056) 並びにトリプトファン (trp) プロモータ系 (ゲッデル (Goeddel) 等、スクレイック アシックス リサーチ (Nucleic Acids Res.), 1980, 8, 4057) を含む。得られる表現ベクタは、コーエン、S. N. (Cohen, S. N.) 等の文献 (プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 1972, 69, 2110) に記載の塩化カルシウム法を用いて、適当な宿主内に形質転換される。首尾良い形質転換体は、通常生きた線毛を生成する株中にみられるよりも高温度で所定のポリペプチド断片を生成できる。勿論、酵母または哺乳類細胞宿主も使用でき、その際適当なベクタおよび調節配列

を使用する。

かくして、一態様において、本発明のT細胞刺激ポリペプチド、好ましくは第1表に示したポリペプチドはHBs Agに、好ましくはHBs Agのアミノまたはカルボキシ末端において作用可能に結合し、融合蛋白、好ましくはフィラメントまたは粒子を形成する融合蛋白を形成する。

E. 複合ポリペプチド免疫原

一態様において、複合ポリペプチド免疫原は本発明のT細胞刺激ポリペプチド、好ましくは病原体関連ポリペプチドに作用可能に結合した、第1表に示したようなポリペプチドを含む。かくして、一態様において、複合ポリペプチド免疫原は、ポリペプチド免疫原に作用可能に結合したコア蛋白のアミノ末端から、その位置約70〜約140のアミノ酸残基配列に対応する配列をもつ、約15〜約70個のアミノ酸残基から本質的になるT細胞刺激ポリペプチドを含む、少なくとも20個のアミノ酸残基を含む。好ましい態様において、T細胞刺激ポリペプチドは第1表に示したような

含む複合免疫原である。

DPRVRGLYPAGG および DPRVRGLY

本発明の複合ポリペプチド免疫原は上で述べた周知の合成および組換えDNA法によって作製できる。

F. 免疫原性を増強する方法

ポリペプチド含有HBcAgT細胞エпитープは、ポリペプチド免疫原、好ましくは病原体関連免疫原の免疫原性を高めるのに使用できる。広くいえば、この目的を達成するための方法はポリペプチド含有HBcAgT細胞エпитープを免疫原に作用可能に結合することを含む。

特に、本発明はポリペプチド免疫原を、HBcAg、好ましくはコア蛋白、より好ましくは粒状コア蛋白に、アミノ酸残基側鎖を介して作用可能に結合することを含む、ポリペプチド免疫原の免疫原性を増強する方法を目的とする。

ペプチド結合により病原体関連免疫原をHBcAg、好ましくはコア蛋白に結合することを含む該免疫原の免疫原性を増強する方法も本発明は目的とす

p70-94、p85-100、p85-96、p100-120、p100-110、p120-140、p120-131またはp129-140である。より好ましくは、複合ポリペプチド免疫原はアミノ酸残基側鎖を介して粒状HBs Agに作用可能に結合したp100-120を含む、即ち、該複合免疫原は粒状HBs Ag-p100-120複合体である。

もう一つの態様において、本発明の複合ポリペプチド免疫原は、本発明のT細胞刺激ポリペプチドを含むものとして特徴付けられ、該ポリペプチドは端部間でペプチド結合によって病原体関連ポリペプチドに作用可能に結合して、少なくとも約15〜約70個のアミノ酸残基をもつ複合アミノ酸残基配列を形成する。

更に好ましいのは、左から右にかつアミノ末端からカルボキシ末端の方向にとって以下の式で表わされる配列からなる群から選ばれるアミノ酸残基配列に、ペプチド結合により、作用可能に結合したp100-120またはp120-140を含む。

る。コア蛋白を用いる場合、結合は好ましくは該コア蛋白のカルボキシ末端で起こる。

本発明は、更にポリペプチド免疫原をT細胞刺激ポリペプチドに作用可能に結合することを含む、該免疫原の免疫原性を増強する方法を意図し、該T細胞刺激ポリペプチドはHBcAgのアミノ末端から位置約70〜約140の該HBcAgのアミノ酸残基配列に対応する配列をもつ約15〜約70個のアミノ酸残基から本質的になる。

上記の免疫原性増強法は、以下に述べる製造法に結合法を用いて達成できる。

G. ワクチン

もう一つの態様において、本発明の免疫原性HBcAg複合体、融合蛋白、T細胞刺激ポリペプチドまたは複合ポリペプチドは、有効量で投与した場合に抗体を誘発し得る製薬上許容される組成物中で使用され、該抗体はポリペプチドまたは病原体関連免疫原と免疫反応し、該ポリペプチドまたは免疫原は、そのアミノ酸残基配列において、該ワクチン（組成物）で用いられる作用可能に結

合したポリペプチドまたは病原体関連免疫原に対応する。

活性成分としてペプチド配列を含むワクチンの調製も当分野で良く知られている。典型的には、かかるワクチンは注射剤(液状溶液または懸濁液)、溶液または懸濁液に通した固体形状として調製される。注入前の液体も調製できる。調剤は乳化してもよい。活性免疫原性成分は製薬上許容されかつ該活性成分と相容性の賦形剤としばしば混合される。適当な賦形剤は、例えば水、塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどおよびこれらの組合せである。更に、必要ならば、このワクチンは少量の補助物質、例えば湿润剤または乳化剤、pH緩衝剤またはこのワクチンの有効性を増強する佐剤を含むことができる。

このワクチンは、注射例えば皮下または筋肉内注射により経口投与するのが有利である。他の投与モードに適した付随的な処方方は坐剤およびいくつかの場合には経口処方物をも含む。坐剤の場合、伝統的なバインダおよび担体は、例えばポリアル

カレングリコ (polyalkylene glycos) またはトリグリセリドを含み、かかる坐剤は0.5~10%、好ましくは1~2%の範囲で活性成分を含む混合物から形成できる。経口処方物は通商使用される賦形剤、例えば薬剤用等級のマニトール、ラクトース、スターチ、ステアリン酸マグネシウム、蔗糖ナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含む。この組成物は溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル剤、持続放出型処方物または粉末の形状をとり、かつ1.0~95%、好ましくは2.5~70%の活性成分を含む。

ポリペプチドは中性または塩の形でワクチンに処方できる。製薬上許容される塩は酸付加塩類(ペプチドの遊離アミノ基と共に形成される)即ち、無機酸、例えば塩酸または磷酸あるいは有機酸、例えば酢酸、乳酸、酒石酸、マンデル酸などとの塩を含む。遊離カルボン酸基と共に形成される塩も、無機塩基例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または鉄水酸化物および有機塩基、例えばイソプロピルアミン、トリ

メチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどから誘導できる。

本発明のワクチンは投与処方物と一致するモードで、治療上有効かつ免疫原性であるような量で投与される。投与すべき量は治療すべき対象、抗体を合成する該対象の免疫系の容量および所定の保護の程度に依存する。投与すべきことが要求される活性成分の正確な量は開業医の判断に依存し、各個体に特異的である。しかしながら、適当な用量範囲は個体1人当たり数100 μ g程度の活性成分である。最初の投与に対する適当な管理およびブースタ注射も有効であるが、最初の投与後1~2週間隔での注射または他の投与を行うことが典型的である。

H. 治療法

H B V 感染の特徴は激しいIgM抗-H B c Ag抗体産生であり、これは感染の急性段階の初期に起こる。同様に、慢性感染患者も、常に低力価ではあるがIgM抗-H B c Agを維持する。逆に、H B s Agは感染中およびワクチン投与後比較的弱いIgM応

答を誘起する。H B V 感染中IgM抗-H B c Ag産生の総合的な血清学的研究において、ゲルリッヒ(Gerlich)等はその論文(ジャーナル オブ インフェクショナル ディゼイズ (J. Infect. Dis.), 1980, 142, 95)において、急性肝炎の治療に際におけるIgM持続性の速度変化および慢性状態に移行する患者におけるIgM抗-H B c Agの極めて緩慢な減少あるいは増大を報告した。

更に、ウイルス複製がプレドニソン療法により再活性化されている慢性肝炎B患者において、IgM抗-H B c 濃度は大巾に高くなるが、IgG力価には変化はない。これらの発見は、H B V 感染におけるIgM抗-H B c 産生がT細胞独立であることおよび更に支配的なIgMから高力価のIgG抗-H B c への変化はT細胞ヘルパー機能を必要とすること(これは患者毎に変化し、かつ慢性化に進行している患者においては不十分である)と一致する。このことは、慢性感染を初めの1~2年間のIgM抗-H B c 力価における緩慢な減少を説明する。H B c AgおよびH B e AgのT細胞認識

は著しく交叉反応性であるので、IgG抗-HBc産生に対するT細胞援助も抗-HBc産生を授けるであろう。

かくして、本発明はHBVに感染した個体におけるHBsAgに対するT細胞応答を増強する方法をも目的とし、該方法は本発明のT細胞刺激ポリペプチドを有効量で投与することを含む。好ましくは、T細胞刺激ポリペプチドは、HBVコア蛋白のアミノ末端からその位置約70〜約140のアミノ酸残基配列に対応する配列をもつ約15〜約70個のアミノ酸残基から本質的になる。

(実施例)

以下の実施例は本発明を例示するものであり、これを制限するものではない。

1. ポリペプチドの合成

本発明で使用する種々のHBsAg領域に対応するポリペプチドを、メリフィールド(Merrifield)等の論文(ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサイエティー(J. Am. Chem. Soc.), 1963, 85, 2149)に記載の固相法によ

各付加のアミノ酸の α -アミノ基は、これが成長中のポリペプチド鎖に付加される前に、第3プトキシカルボニル(t -BOC)基で典型的に保護される。次いで、この t -BOC基は成長中のポリペプチド鎖に次のアミノ酸を付加する前に除去される。

反応性アミノ酸側鎖は該ポリペプチドの合成中保護される。通常の側鎖保護基は以下のように残りのアミノ酸残基に対して使用される: チロシンに対して o -(p -ブロモベンジルオキシカルボニル); スレオニン、セリン、アスパラギン酸およびグルタミン酸に対して o -ベンジル; システインに対して4-メチルベンジルおよび s -メトキシベンジル; ヒスチジンに対してジニトロフェニル; リジンに対して2-クロロベンゾキシカルボニルおよびアルギニンに対してトシル基。

アブライド バイオシステム モデル430Aペプチド合成装置により合成されたペプチドはハーゲンマイヤー(Hagenmaier, H.) & フランク(Frank, A.)の対称無水物法[ホッパーセラー

り化学的に合成した。ポリペプチド合成の固相法はベガ(Vega) 250ペプチド合成装置およびアブライド バイオサイエンスズ(Applied Biosciences) 430Aペプチド合成装置(夫々、アリゾナ州、タucson, AZ)のベガ バイオテクノロジーズ社(Vega Biotechnologies Inc.)、およびフォスターシティ、CA(Paster City, CA)のアブライド バイオシステムズ社(Applied Biosystems)から入手できる)を用いて実施した。各ポリペプチド組成物はアミノ酸分析により確認した。

簡単にいえば、上記の固相法で合成ポリペプチドを調製する場合、アミノ酸残基は、カルボキシ末端とのエステル結合により樹脂(固体担体)に結合される。このポリペプチドがCys残基を介して担体または他のポリペプチドに結合されるかあるいは末端Cys残基を介して反応させようとする場合、該Cys残基を、これにエステル結合されるカルボキシ末端をもつ残基として使用することが有利である。

ズ ツァイトシュリフト フィジオロジカル-ケミストリー(Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.), 1982, 353, 1973)を用いて行った。メリフィールド等(ジャーナル オブ アメリカンケミカル ソサイエティー(J. Am. Chem. Soc.), 1963, 85, 2149)により記載されたようなDCCインシチュール(in situ)法はベガ250ペプチド合成装置からのペプチド合成に使用した。後続の保護アミノ酸の繰返しカップリングはしばしば完全なカップリング効率で行う必要があった。すべてのカップリング反応はサリン(Sarin) (アナリティカル ケミストリー (Analytical Chemistry), 1981, 117, 147)の定量的ニヒドリンテストによれば99%完全であった。所定のポリペプチドの調製後、得られた保護ポリペプチドの一部(約1g)を2mlのアニリジンおよび無水弗化水素(約20ml)で処理し、氷/ドライアイス温度にて反応容器中で濃縮して混合物を形成した。得られた混合物を、約4℃にて約1時間攪拌して保護基を脱離し、かつポリペプチドを抽出した。

脂から除去した。N₂気流下で4℃にて弗化水素を蒸発させた後、残渣を3回無水ジエチルエーテルで抽出してアニソールを除き、残渣を乾燥した。乾燥物質を5%水性酢酸で抽出(50 ml、3回)して、樹脂から遊離ポリペプチドを分離した。抽出物含有液を凍結乾燥して、ポリペプチドを得た。

2. ポリマーの調製

本発明のポリペプチドポリマーは、上記実施例1のようにアミノ-およびカルボキシ両末端にシステイン残基を含む本発明のポリペプチドを合成して、非酸化かつ環元型で"ジCys-末端をもつ"ポリペプチドを形成することにより調製できる。典型的な実験室合成の後、10 mgのジCysポリペプチド(非酸化形でシステイン残基を含む)を0.1 M重炭酸アンモニウムバッファー250 ml中に溶解する。次いで、この溶解ジCys-末端をもつポリペプチドを、得られた溶液を空気中にて、室温で約18時間ゆっくり攪拌することにより、空気酸化する。あるいは、核攪拌をエルマン(Ellman)テスト(エルマン、アーチブス オブ

バイオケミストリー&バイオフィジックス

(Arch. Biochem. Biophys.), 1959, 82,

70-77)により遊離メルカプタンが検出されなくなるまで続ける。

かくして調製されるポリマーは、一緒に酸化されたシステイン(シスチン)残基によって結合された合成、無秩序コポリマーポリペプチドを複数種含む。

3. 担体へのカップリング

合成ポリペプチド免疫原は、リユー(Liu)等の記載している方法[バイオケミストリー(Biochem.), 1979, 80, 690]により免疫原性担体としてのHBcAgに結合できる。簡単に述べると、担体(HBcAg)4 mgを0.51 mgのm-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルで活性化する。この活性化HBcAgは、次いでアミノ-またはカルボキシ末端をもつシステインを介して5 mgのポリペプチド免疫原と反応されて、約10~約35 wt%のポリペプチド免疫原を含む抱合体を与える。

4. HBcAgおよびHBsAgの免疫原性の比較

一連のH-2-コンジュニク系を含む多数の同系交配二十日ネズミ系を4 μgのrHBcAgまたはHBsAg(両者共粒状抗原)の完全フロイントアジュバント(CFA)溶液で免疫し、かつ一次IgG抗体応答性をほぼ同程度の感度をもつ固相放射性免疫検定(RIA)によって分析した。これら検定の結果は市販品として入手できる抗-HBsAgおよび抗-HBcAg検定(アボット: Abbott)により得られた結果と相関性を有し、かつ等しく大きな感度を示した。HBcAgで免疫した全系は微しい、一次IgG抗-HBcAg応答性を示した(第2表)。

第2表:

HBsAgおよびHBcAgで免疫後の一次抗体応答の比較

| 系 ¹ | H-2 ² | 抗-HBs(力価) | 抗-HBc(力価) |
|---------------------|------------------|----------------|-----------|
| B10 | b | 256 | 40,960 |
| B10.D2 | d | 1,024 | 81,920 |
| B10.S | s | 0 ³ | 163,840 |
| B10.BR | k | 32 | 163,840 |
| B10.M | f | 0 ³ | 20,480 |
| C ₃ H. Q | q | 2,048 | 327,680 |
| Balb/c | d | 1,024 | 327,680 |

1: 同系交配二十日ネズミ系B10、B10.D2、B10.S、B10.BR、B10.M、C₃H. QおよびBalb/cはカリフォルニア、

ラジョラ(La Jolla)のリサーチインスティテュートオブスクリップスクリニ

ック (Research Institute of Scripps Clinic) の近親交配コロニーから得た。すべての研究において6~8週令の雌マウスを用いた。

2: 各系からの5匹のマウスからなる群をCFA中の4.0 mgのHBsAgまたはHBcAgで免疫し、ブールしておいた血清を、24日目に示した特異性のIgG抗体につき固相RIAにより分析した。データは最大血清希釈率の逆数として(免疫前の血清の4×の計数(力価)とするに要する希釈率)表示した。

3: H-2^a およびH-2^b ハプロタイプは二次免疫後でさえもHBsAgに対し非応答性である。

抗-HBc応答性におけるH-2-結合遺伝子の影響は明らかである。即ち、B10.S、B10.BR系の応答はB10、B10.D2、B10.Mの応答よりも大きい非応答系は認識されなかった。抗-HBcAg応答はテストした全系において抗-HBsAg応答性よりも著しく大きか

マウスは10日目に投与量依存性の抗-HBcAg抗体を生産し、24日目には抗-HBcAg力価が4~16倍に増大した。しかしながら、B10.BR nu/nuマウスも投与量依存性の抗-HBcAg抗体産生を免疫してから10日目に示したが(第4図(b))、24日目においても抗-HBcAg力価の増加を示さなかった。完全フロインド アジュバントは必要とされない。というのは、不完全アジュバント中のHBcAgで免疫した場合にもB10.BR nu/nuは、力価は低いものの抗-HBcを産生するからである。また、無胸腺マウスによる抗-HBc産生は、E. コリ由来のrHBcAgに固有のものではない。なぜならば、酵母由来のrHBcAgによる免疫も同等の応答を誘発するからである。

第4図(a)および(b)において、5匹のB10.BR胸腺機能正常(+/+)(第4図(a))またはB10.BR無胸腺症(nu/nu)(第4図(b))マウスの群に、E. コリ由来の組換えHBcAg(rHBcAg: バイオゲン(Biogen))とし

った(少なくとも80倍)。更に、高力価抗-HBcAgが、この単一回のHBcAg投与後1年後にもこれらマウス中で持続している。一次抗-HBcAgおよびHBsAg応答の相対的な強度およびHBcAgに応ずる非応答がないことは、一般にHBV感染中のこれらHBV抗原に対するヒト免疫応答と一致している。

5. HBcAgのT細胞独立性

B細胞を直接活性化するHBcAgの能力、即ちT細胞独立免疫原として作用する能力を調べた。5匹のB10.BR胸腺機能正常(+/+)マウスまたはB10.BR無胸腺症(nu/nu)マウスからなる群を、E. コリ(E. Coli)由来の組換えのHBcAg(rHBcAg: バイオゲン(Biogen))の0.5、1.5または4.0 μgのいずれかで一回腹腔内投与により免疫した。

免疫から10日および24日後に、血清を集め、ブールし、かつ実施例4に記載の固相RIAを用いて、抗-HBcAg抗体の存在につき分析した。

第4図(a)に示したように、B10.BR+/+

での粒状コア蛋白4.0 μg (●)、1.5 μg (○)または0.5 μg (■)をあるいはCFA中の変性コア蛋白(D-HBcAg) 1.5 μg (□)を単一回腹腔内投与により免疫した。粒状コアは0.1% SDSおよび0.1% 2-メルカプトエタノールによる最終濃度により、37℃で2時間処理して変性した。免疫から10日および24日後に、血清を集め、ブールし、固相RIAにより抗-HBcAg抗体活性につき分析した。粒状コアは固相リガンドとして機能し、山羊抗-マウスIg抗体を2次抗体とし、かつ山羊Igに対する¹²⁵I-標識抗体をプローブとして用いた。

6. HBcAgに対するT細胞感度

HBcAg刺激に対するT細胞の感度を調べた。各4匹のマウス系からなる群を、後足に、CFA中の4 μgのHBcAg(粒状コア蛋白)を投与して免疫し、8日後に排出されるリンパ節細胞を収穫し、インビトロでHBcAgの種々の濃度下で培養した。24時間培養した後上澄を集め、NK細胞、A、IL-2依存セルラインを用いて、標準IL-2

ー2バイオアッセイによりIL-2産生につき検定した。IL-2産生は当分野においてT細胞活性化の高感度の尺度として周知である。

第5図はこの研究の結果を示す。高度に応答性の系はHBcAg-特異的T細胞活性化を0.03ng/ml程度のHBcAg濃度で示すことが立証された。この濃度は0.0014nMに等しい。第5図の結果、即ち著しいIL-2産生を誘発するに要するHBcAgの最小濃度による種々のH-2コンジュニク系に対する結果の比較は、インビボ抗体産生（即ち高、低および中間）により観測されたものと同様な分数を与える。

驚くべきことに、上記の如く高応答性の系は、0.03ng/ml程度の低いHBcAg濃度でHBcAg-特異的T細胞活性化を示した。本出願人は、T細胞の活性化に關るこれ程の効率を、他の抗原が呈することを知らない。

7. 応答に対する免疫化用量の作用

HBcAg-特異的T細胞増殖応答に対する免疫化用量の影響をも調べた。各4匹のC₃H、Qマウ

スからなる群を、その後足にCFA中のHBcAg 12、8、4または1μgのいずれかを注射することにより免疫した。排出される腋窩リンパ節細胞を各マウスから無菌状態で取出し、細分して単一細胞懸濁液を得た。この細胞を、磷酸緩衝塩水(pH 7.2)を含む平衡化した塩溶液(BSS)で2度洗浄した。この細胞を、BSS、L-グルタミン、ビルビン酸ナトリウム、抗生物質、2-メルカプトエタノール、必須および非必須アミノ酸およびビタミンを含むクリック培地(Click's medium)中に再懸濁した(クリック等の文献、セルイムノロジー(Cell Immunol.), 1972, 3, 264参照)。クリック培地を10mMのHEPES(n-2-ヒドロキエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸およびグルタミン(10μg/ml)を加えて変性し、かつ0.5%のシンジェネティック正常マウス血清を仔ウシ血清に変えることにより改良した。

この抗原を、HBcAg処方物の0.00015~0.25μg/mlなる投与量範囲に亘り、培養物中で検定

した。

0.1mlの培地中の生きたリンパ節細胞(5×10^5)を平底マイクロタイタのウェル(ファルコン(Falcon)3072;ファルコンプラスチック社(Falcon Plastics, Inc.))に、1μg/mlの濃度でHBcAg処方物を含む培地0.1mlと共に設置した。

培養物を、湿った5%CO₂含有空気中で、37℃にて5日間維持した。

4日目に、各培養物を1μCiの³H-チミジン(³HTdR)(6.7Ci/mM, MA, ボストンのニューイングランドヌクレアー(New England Nuclear))と共に16時間混合維持した(インキュベート)後、収穫した。細胞をフィルタストリップ上に収穫し、増殖を、DNA中に³HTdRを導入することにより測定した。このデータは抗原のない状態でのバックグラウンド増殖に対し補正した1分当たりの計数値(cpm)として表される。以前に、免疫後13日までに収穫された排出PLN細胞のHBsAg-特異的増殖応答は増殖T細胞に

よるものであることが立証された(ミリッヒ(Millich)等、ジャーナル オブ イムノロジー(J. Immunol.), 1983, 130, 1401)。従って、未分画のPLN細胞をここで記載する分画で使用した。

この研究の結果は第6図に示す。この結果は、上記の如く、4匹のマウス(C₃H、Q)からなる群に、その後足にCFA中の粒状コア蛋白12、8、4または1μgのいずれかを投与して免疫し、8日後に排出されるリンパ節細胞を該粒子の種々の濃度と共に培養し、培養96時間後にT細胞増殖を(³H)-TdR配合により測定したものである。これらの結果は1μg程度の低いインビボ投与量で十分なT細胞の活性化が誘発されたことを示した。比較によれば、16μgのHBsAg投与量が同様なT細胞応答を誘起するのに必要とされる。殆どの非球状抗原系において、50~100μgの投与量が通常大きなT細胞応答性を誘起するのに必要とされる。従って、本出願人は、HBcAgが予想外に高い生体内でのT細胞活性化

刺激能を持つことを見出した。

8. 粒状HBcAgの評価

T細胞独立性が、HBcAgが粒状であることを必要とするかを決定するために、各5匹のB10.BR胸腺機能正常マウス(+/+)またはB10.BR無胸腺症(nu/nu)マウスからなる群を、CFA中の1.5μgの変性HBcAg(D-HBcAg)を単一回腹腔内投与することで免疫した。HBcAgは0.1%SDSおよび0.1%2-メルカプトエタノールなる最終濃度で、37℃にて2時間処理することにより変性した。得られた調製物をHBcAgに対するモノクローナル抗体と免疫反応させたが、HBcAgに対するモノクローナル抗体との免疫反応性の95%以上を失った。モノクローナル抗体(タカハシ(Takahashi)等、ジャーナル オブ イムノロジー(J. Immunol.) 1982, 130, 2903)はM. マユミ(M. Mayumi)〔自治医大(Jichi Medical School, Japan)〕から得た。免疫から10日および24日後、血清を集め、ブールし、かつ実施例4記載の

は逆に、異なるサブユニット構造(即ち、重合度)をもつかもしれないという可能性である。

9. HBcAgおよびHBsAgに対するインビボ応答速度の比較

インビボでの抗-HBcAgおよび抗-HBsAg抗体産生の相対的速度を調べ、かつHBcAg処方が固有のアジュバントシティーをもたないことを立証するために、5匹のBalb/c胸腺機能正常(+ / +)マウスおよび無胸腺症(nu/nu)マウスの群をCFA中のrHBcAg(8μg)とHBsAg(8μg)との混合物で腹腔内投与により免疫した。免疫前およびその後6、12および24日後の血清サンプルをブールし、かつ実施例4と同様に固相RIAにより抗-HBcAg抗体の存在およびミリッヒ(Milich)等〔ジャーナル オブ イムノロジー(J. Immunol.) 1982, 1279, 320〕に記載のようにして抗-HBsAg抗体の存在につき分析した。

この研究の結果を第7図に示す(ここで第7図(a)はBalb/c胸腺機能正常マウスに関するも

ように固相RIAにより、抗-HBcAg活性につき分析した。

この研究の結果は、免疫原として未変性(天然)HBcAgを用いた実施例5の結果と比較できるように、第4図(a)および第4図(b)に示す。第4図(a)において、D-HBcAgはB10.BR+/+マウスにおいて天然HBcAgよりも大巾に低い免疫原性を示すが、変性HBcAgと反応性の抗体は24日には検出できた。

逆に、第4図(b)はB10.BRnu/nuマウスがD-HBcAgに対して応答しないことを示しており、このことはD-HBcAgに対する応答が、HBcAg-特異的応答(第4図(a)、(b))とは異って、T細胞依存性であることを示している。D-HBcAgはモノクローナル抗-HBcAgに結合し、かつ元のHBcAg抗原性の5%未満を表現したので、D-HBcAgはHBcAgを抗原として表現した。しかしながら、D-HBcAgもHBcAgを免疫原として表現するという仮定に対する反論は、天然産のHBcAgがD-HBcAgと

のであり、第7図(b)は同じく無胸腺症マウスに関する結果である。また、データは免疫前の血清の計数値の4×とするに要する最大血清希釈率のlog₂の逆数で示してある)。この第7図の結果はBalb/c+/+マウスが、免疫後早くも6日目に抗-HBcAg抗体を産生し、その力価は24日後にも増大し続けることを示している。しかしながら、抗-HBsAg抗体の存在は12日後まで検出されず、観察全期間を通じて著しく低かった(第7図(a))。逆に、Balb/cnu/nuマウスは抗-HBsAg抗体を全く産生せず、一方抗-HBcAg抗体は6日前に産生され、力価は12日でピークに達し、24日まで減少し続けた(第7図(b))。

Balb/cnu/nuマウスに抗-HBsAg応答がみられないことは、以前にロバーツ(Roberts)等〔ネイチャー(Nature), 1975, 254, 606〕により記載されたように、HBsAgのT細胞依存性と一致する。しかし、この研究および実施例5~8に記載の研究から、HBcAgがT細胞

胞独立抗原として機能し得ることが明白である。

10. H B c Ag および H B e Ag に対する 11. T 細胞応答の比較

H B c Ag および D-H B c Ag (即ち、H B e Ag) に特異的な T 細胞応答がこれら 2 つの抗原の免疫原性の差異を説明し得るかを調べた。

4 匹の C₃H、Q マウスからなる諸群を、C F A 中の H B c Ag 4.0 μ g または変性 H B c Ag (D-H B c Ag) 4.0 μ g のいずれかで後足に投与して、免疫した。8 日後、排出リンパ節細胞を収獲し、ブールし、かつ種々の濃度の H B c Ag、超音波処理 H B c Ag (D-H B c Ag)、H B c Ag/H B e Ag-特異的合成ペプチド (残基 100-120 を表す) または培地のみに培養した。D_s-H B c Ag は、抗-H B c および抗-H B e モノクローナル抗体とまったく非反応性となるまで超音波処理されている。T 細胞活性化を抗原誘起 I L-2 産生により測定した。インビトロ培養開始 24 時間後に、上清を集め、かつ実施例 5 におけるように I L-2 含量につき検定した。

で H B c Ag-感作 T 細胞により I L-2 産生を誘発した (第 8 図 (a))。

逆の実験において、D-H B c Ag-感作 T 細胞は r H B c Ag-感作 T 細胞と同様に、r H B c Ag および D_s-H B c Ag を認識した (第 8 図 (b))。r H B c Ag 粒子は感作抗原には無関係に良好な識別を示すので、抗原の粒状形はより一層効率良く貪食されかつ T 細胞に与えられる。同様に、H B e Ag の r H B c Ag-感作 T 細胞活性化能が調べられ、未精製 r H B e Ag が H B c Ag-感作 T 細胞を活性化できることを見出した。

上記の研究は、H B c Ag および H B e Ag が T 細胞レベルでは明らかに識別不能、即ちこれら両者ともに同一の T 細胞刺激エпитープを表現することを示している。これはたとえ H B c Ag と H B e Ag とが血清学的に別であろうとも真である。この結論を一致して、H B c Ag/H B e Ag 重複配列内の残基 100-120 を表す 21 個の残基の合成ペプチド (第 1 表に記載した合成ポリペプチド p 100-120) はインビトロで H B c Ag-感

かくして得た結果を第 8 図に示した。第 8 図 (a) は粒状コア蛋白 (H B c Ag) に関する結果であり、第 8 図 (b) は D-H B c Ag に関する結果である。また、H B c Ag および D_s-H B c Ag の検定濃度範囲は 0.0015~1.0 μ g/ml であり、ポリペプチドは 0.06~240 μ g/ml であった。I L-2 産生は、抗原処理培養物の上澄中の培養 NK-A 細胞による ³H-T d R 取込みから、抗原で処理されていないコントロール培養物からの上澄中にみられた ³H-T d R 取込みを引いた値 (Δ CPM) で表示されている。これは 3 つの別々の場合について実施された実験の代表的検定である。

第 8 図 (a) および (b) に示すように、H B c Ag-感作 T 細胞の H B c Ag および D_s-H B c Ag 両者に対する応答は投与量-応答カーブの最大末端部 (0.06~1.0 μ g/ml) においては同等であった。投与量-応答カーブの濃度の低い部分では粒状形の方がより有効であった。驚くべきことに、H B c Ag は 0.15 μ g/ml 程度の低い抗原濃度の下

作 T 細胞を活性化し得ることがわかった (第 8 図 (a))。

11. T 細胞刺激ポリペプチドの同定

H B c Ag/H B e Ag 重複配列内の T 細胞決定基は合成ポリペプチドを用いて局在化された。各 4 匹の C₃H、Q、B 10.S、B 10.D 2、B 10、B 10.M、B 10.B R および B 10.P 系マウスの諸群を 4 μ g の H B c Ag で免疫し、排出されるリンパ節細胞を免疫後 8 日目に収獲し、合成ペプチドまたは正のコントロールとしての粒状 H B c Ag と共にインビトロで培養した。T 細胞活性化率を濃度範囲約 0.00003~約 64 μ g/ml の種々の濃度のポリペプチドを用いて、実施例 5 記載のように I L-2 産生に基き測定した。

各ペプチドの最適濃度により誘発された I L-2 産生を第 9 図に示す。濃度範囲は約 16-64 μ g/ml である。粒状コア蛋白 H B c Ag の濃度は 0.5 μ g/ml であった。

別々のペプチドは異なる二十日ネズミ系により認識された。C₃H、Q 系は p 1-21 および p 100

-120配列を、B10.S系(第9A図)はp28-52およびp120-140配列を、B10.D2系(第9A図)はp70-94、p85-100(重複)およびp120-140配列を、B10系はp120-140配列を排他的に、およびB10.M系はp100-120配列を排他的に識別した。B10.BRおよびB10.P系に対するT細胞識別サイト(両方共第9B図)はまた同定されていない。全ての活性サイトはHBcAgおよびHBsAg配列両者に共通しており、このことはこれらの抗原が、B細胞(抗体)レベルの状況と対照的に、T細胞レベルで交叉反応性であることを示している(これらは上記結果の示す最も重要な点である)。

12. HBcAgのT細胞増殖

合成ペプチドp120-140の、HBcAg-特異的T細胞増殖応答を誘起・誘発する能力をB10.S系で調べた。各4匹のマウスからなる諸群を4μgのHBcAgまたは100μgのp120-140のいずれかをその後足に投与して免疫し、

示したが、この結果はこれら研究におけるHBcAgおよびp120-140に対する投与量-応答カーブはB10.S系におけるよりも一層密接に関連付けられることを示している。このことは、p120-140がB10系に関する唯一のT細胞認識サイトを表すことを示しているように思われる。

同様に、C₃H、Qマウス系におけるHBcAg-特異的T細胞増殖応答を誘起・誘発する能力について、合成ポリペプチドp100-120およびp1-20を調べた。第12(a)図は、HBcAg-感作C₃H、QのT細胞がp100-120およびp1-20両者を認識するが、p100-120はより一層有効なT細胞刺激体であることを示している。ペプチドの増殖応答能は、該ペプチドの天然蛋白に相対的な増殖応答誘発能と相関性でないことがわかった。該p1-20配列は優れたペプチド免疫原である(第12図(b)がp100-120による免疫はより良好なHBcAg-特異的応答を誘発する(第12図(c))。この研究において、C₃H、QのT細胞はインビボで粒状コ

8日後に脾臓リンパ節を収獲し、かつ上記抗原と共にインビトロで培養した。実施例5と同様にしてIL-2産生を測定した。

第10図(a)は、HBcAg-感作B10.S系のT細胞が極めて効果的にp120-140を識別することを示している。投与量-応答カーブを調べることにより、0.00015 μg/μl程度の低いp120-140濃度がIL-2産生を誘発するのに十分であることがわかる。B10.S系のHBcAg-感作T細胞はp85-100配列を識別しなかった。逆の研究において、B10.Sマウスはp120-140で感作された。このp120-140-感作T細胞は免疫ペプチドを識別し、p85-100配列を識別せず、かつ天然HBcAgを認識した(第10(b)図)。天然蛋白で感作したペプチド-特異的T細胞増殖は、ペプチドで感作したHBcAg-特異的T細胞増殖よりも一層有効であることに注意すべきである。

同様な研究を、B10マウス系をT細胞源として用いて行った。これら研究の結果を第11図に

ア蛋白(HBcAg;第12図(a)参照)、合成ポリペプチドp1-20(第12図(b))または合成ペプチドp100-120(第12図(c))のいずれかで感作された。インビトロ増殖刺激は図示の様々な抗原濃度においてHBcAg、p100-120またはp1-20について与えた。

同様に、ペプチドp85-100のHBcAg-特異的T細胞増殖応答誘起能をB10.D2系で調べた。結果を第13図に示した。粒状コア蛋白(HBcAg;第13図(a))またはペプチドp85-100(第13図(b))のいずれかでインビボでB10.D2系のT細胞を感作した。インビトロ増殖刺激性は図示した様々な濃度のHBcAg、p85-100またはp120-140について与えた。第13図(a)に示すように、B10.D2系の粒状HBcAg-感作T細胞はp85-100およびp120-140の両者を識別できた。しかし、このマウス系ではp85-100の方がより有効なT細胞刺激体である。同様に、p85-100はT細胞を感作できた。該T細胞は天然H

(AS) 00822-12 昭和64年

特開昭64-25800 (23)

B₁₀Agおよび免疫ペプチドを識別した(第13図

(b))。また、抗-HBcAg抗体の生成は、

13. 抗体のクラスおよびサブクラス分布

(抗-HBcAg応答における)

(1) IgGクラス、抗-HBcAg抗体の産生が厳密に

T細胞の作用を必要とするか否かを決定するため、

抗-HBcAg産生の該クラスおよびIgGサブクラ

ス分布を、HBcAgで免疫したB10.BR+/+

およびB10.B.Rnu/nuマウスにおいて調べた。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表参照。

第3表

B10.BR(+/+) およびB10.BR (nu/nu)

マウス中に生成される抗-HBcAg 抗体

のクラスおよびサブクラス分布

| | | 抗-HBcAg 応答 | | | | | |
|---------|------|------------|---------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| 系 | 経過日 | IgM | PolyIgG | IgG ₁ | IgG _{2a} | IgG _{2b} | IgG ₃ |
| | 数(日) | | | | | | |
| B10.BR | | | | | | | |
| (+/+) | 10 | 2.560 | 40.950 | 40 | 2.560 | 10.240 | 640 |
| | 24 | 1.280 | 163.840 | 640 | 20.480 | 163.840 | 2.560 |
| B10.BR | | | | | | | |
| (nu/nu) | 10 | 1.280 | 2.560 | 0 | 0 | 2.560 | 0 |
| | 24 | 1.280 | 2.560 | 0 | 40 | 2.560 | 0 |

1: 各5匹のB10.BR系胸腺機能正常(+/+)

マウスまたはB10.BR系無胸腺症(nu/nu)

マウスからなる各群をCFA中の4.0μgの

HBcAgで免疫し、血清を実施例4と同様に

RIAにより、10日後および24日後に、

IgMクラスおよびIgGクラス並びにサブクラ

スのHBcAgに対する抗体につき分析した

(IgGサブクラス-特異的二次抗体使用)。

データは免疫前の血清の計数値(力価)の4

×とするに要する最大血清希釈率の逆数とし

て表した。

2: 血清を収獲した、免疫後の日数。

第3表のデータを分析すると、B10.BR

(+/+)マウスは免疫後10日および24

日に、IgMクラスの抗-HBcAgおよびIgG

サブクラスの全スペクトルを生成したが、

IgG₁サブクラスの抗体が支配的であったこ

を示している。IgM抗体は10日と24日

との間でわずかに減少しており、一方IgG抗

体は4~16倍に増大していることに注意す

べきである。B10.BRnu/nuマウスもIgG

クラス、即ちIgMクラス応答よりも高力価の

抗-HBcAg応答を生ずるが、IgG応答は

IgG₁サブクラスが支配的であった。従って、

IgGクラス自体の抗-HBcAg産生はT細胞

感作のマーカーではないが、IgGサブクラス

の多様性は増大し、かつIgG力価は増大した。

これらの実験において、一回の比較的少量の

用量で粒状HBcAgを用いた。一方、HBV

感染中に生成されるHBcAgの量はより多く

かつウイルス複製段階中ずっと持続するであ

らう。

14. T細胞-刺激ポリペプチド感作T細胞の、

病原体関連免疫原に対する抗体産生を補助

する能力

HBcAg感作T細胞が、たとへHBsAgおよび

HBcAgが同一のビリオン内の異なる分子上にあろ

うと、表面エンベロープ(HBsAg)エピトープ

に対する抗体産生に対してヘルパーT細胞として

機能する能力を調べた。各5匹のB10.Sマウス

の諸群を、CFA中の4.0 μ gのHBcAg、CFAのみまたはCFA中の100 μ gの合成ペプチドのいずれかにより腹腔内経路で免疫した。感作してから3週間後、マウスを不完全アジュバントのみ、またはHBcAg(0.1 μ g)とHBsAg/p39(0.6 μ g)との混合物の単最適用量、または不完全アジュバント中のHBV(0.4 μ g)のいずれかで免疫した。HBsAg/p39およびHBV処方物はadw_sサブタイプのものであり、かつミリッヒ(Milich)等(J. Immunol., 1986, 137, 315)により記載されたようにS、pre-S(2)およびpre-S(1)領域抗原性のほぼ等しい量を含むように平衡化された。この誘発投与後7日してから、血清を集め、ブールし、かつHBsAgのS、pre-S(2)およびpre-S(1)領域に特異的なIgG抗体につき、ミリッヒ(Milich)等(J. Immunol., 1986, 137, 315)により記載のように固相RIA法で分析した。抗-s、抗-pre-S(2)および

抗-pre-S(1)特異的抗体の検出に用いた固相リガンドは、夫々HBsAg/p25、p133-145によって表わされるpre-S(2)領域配列およびp94-117によって示されるpre-S(1)領域の配列であった。抗体力価は、免疫前の血清の計数値の4倍の値とするに必要とされる最大血清希釈率のlog₂の逆数で表わされている。

この研究の結果は第14図に示した。この結果は未感作マウスはエンベロープ特異性抗体を全く生成しないことを示している。第14図において、左の図はB10.SマウスをCFAのみで感作したものであり、中央の図はCFA中のHBcAgで感作したものであり、右の図はCFA中のp120-140で感作したものである。また、3週間後の誘発において上記混合物は単なる混合物であって作用可能に結合したものではなく、HBsAg/p39はpre-S(1)、pre-S(2)およびS領域抗原を有している。

同様に、HBcAgで感作し、かつHBcAgとHBsAg/p39の混合物で誘発したマウスは抗-HBs

を生成しなかった。しかしながら、HBcAgで感作し、次いでビリオン(HBV)で誘発したマウスは抗-S、抗-pre-S(2)および抗-pre-S(1)特異的抗体を産生した。この結果は、HBcAg-感作T細胞が抗-エンベロープ抗体産生を補助するよう作用し、かつTh細胞活性はHBcAgおよびHBsAgが同一の粒子(ビリオン)内に存在していることを要求(というのは混合物は有効ではないから)することを示唆している。

上記結果(HBcAg感作が抗-HBcをも誘発する)のT細胞特性を確認するため、同等な研究を、感作抗原として合成T細胞刺激ポリペプチドp120-140を用いて行った。このペプチドはHBcAg-特異的T細胞を誘発するがHBcAg-特異的B細胞(抗体)を誘発しない。得られた結果は、感作抗原として天然HBcAgを用いたもの(第14図)と同様であった。p120-140で感作し、かつHBVで誘発したマウスは抗-エンベロープ抗体を生成し、一方p120-140で感作し、上記混合物で誘発したマウスはこれを

生成しなかった。B10.S系マウスはHBsAgのS領域に非応答性であり、しかもHBcAg-特異的ペプチドで感作したものは、B10.S系のT細胞を識別したHBV上の別のTh細胞識別サイトを与えることにより、HBsAg/p25に対して非応答性でなくなることも注目すべきである。

これらの結果は、明らかにHBcAg-感作T細胞が、HBcAgとHBsAgとが同一粒子中にある即ち作用可能に結合していれば、S領域、pre-S(2)領域およびpre-S(1)領域-特異的B細胞クローン生成抗体を補助するのに十分資格があることを立証している。更に、これらの結果は、分子間/構造内Th細胞機能がインフルエンザ系に固有ではなく、かつ合成T細胞エビトープ(T細胞刺激ポリペプチド)がこの応答を媒介し得ることを実証している。Balb/cマウスのHBcAg-感作T細胞もエンベロープ-特異的抗体産生を誘発できたが、B10.S系のT細胞よりも効果は低かった。従って、分子間/構造内Th細胞機能の有効性は変化でき、かつH-2ハプロタイプの中で

HBcAgの異なるT細胞識別の微視的特異性に関連しているかも知れない。

15. p120-140で感作後の抗体産生の微視的特異性

HBcAgおよびp120-140-感作Th細胞の影響の下で生成された抗-エンベロープ抗体の微視的特異的の差異を次に調べた。実施例14に従って感作、誘発実験を行った。但し、血清は誘発投与後7日および14日してから集めた。この研究の結果を第4表に示す。

第 4 表:

B10.Sマウス系での、HBcAgまたはp120-140で感作した後の抗-エンベロープ抗体産生の微視的特異性

| 感作* | 誘発 | 時間 (d) | S 領域 9747 [†] | 抗体力価 (1/希釈率) | | | | 領域* | |
|----------|-----|-----------|---------------------------|----------------------|-----------------------------|--------------------|---------|----------|------|
| | | | | Pre-S(2) n133-140 | 領域 [†] p135-145 | Pre-S(1) p32-53 | p94-105 | p106-117 | |
| 0 | HBV | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| HBcAg | HBV | 7 | 640 | 80 | 40 | 160 | 80 | 320 | 320 |
| | | 14 | 2560 | 320 | 640 | 1280 | 2560 | 1280 | 1280 |
| p120-140 | HBV | 7 | 80 | 160 | 80 | 160 | 0 | 160 | 160 |
| | | 14 | 320 | 1280 | 160 | 320 | 320 | 320 | 160 |

1: 各4匹のB10.Sマウスからなる諸群を、CFAのみ(0)、CFA中の4.0μgのHBcAgまたはCFA中の100μgのp120-140で感作した。3週間経過後、全マウスを準最適用量の不完全アジュバント中のHBV(0.4μg)で誘発し、実施例14におけるように、誘発後7日および14日経過時点で、抗原のパネルに対するIgG抗体につきRIAにより血清をテストした。結果(力価)は免疫前の血清の計数値の4×にあたる値とするに要する血清希釈率の逆数で表示されている。

2: adサブタイプのHBsAg/P25は、サブタイプ+群特異性抗-Sを検出するのに用いた固相リガンドであり、一方ayサブタイプのHBsAg/P25は群-特異的抗-Sを検出するのに用いた固相リガンドであった。

3: 使用のpre-S(2)領域の合成ペプチドは、pre-S(2)領域内の支配的抗体結合サイトを表すために、前に示されている。

4: 使用したpre-S(1)領域の合成ペプチドは

前に該pre-S(1)領域内の支配的抗体結合サイトを示すために既に示されている。

(ミリッヒ(Hillich)等、ジャーナル オブ イムノロジー(J. Immunol.), 1986, 137, 2703)。

第4表に示したように、HBcAgまたは合成T細胞刺激ペプチドp120-140による感作は、HBVで誘発した後、HBsAgのSおよびpre-S領域内の7種の別々のエピトープに対して抗体産生を生じた。従って、HBcAg-感作T細胞は、多重B細胞クローンに機能性のT細胞補助を与えるのに十分であり、該クローンはエンベロープの種々の抗原決定基(3種のpre-S(1)エピトープ、2種のpre-S(2)エピトープおよびS領域の基およびサブタイプ特異的エピトープを含む)に対して特異的である。これはp120-140-感作T細胞の状況において特に顕著であり、T細胞は比較的限られた異質性のT細胞密度(即ち1~数個のT細胞特異性)を表す。

HBsAgのpre-S(1)領域の合成ペプチドは

免疫応答の調節は広範に研究されている。HBsAgのS、pre-S (2) およびpre-S (1) に対する抗体産生はTh細胞により独立に調節され、該Th細胞は各領域の固有の決定基を識別し、かつ独立にII-2制限性(H-2 restricted)である。更に、Sおよびpre-S領域決定基は同一のポリペプチド(P39)上にあるので、一領域上の決定基に特異的なTh細胞は、もう一つの領域上の決定基を認識するB細胞クローンに機能上の援助を与えることができる。これについては第15図参照。従って、S領域およびpre-S (2) 領域非応答性はHBsAg/P39で免疫することで回避できる。

第15図において、B細胞(抗体)の側は抗原性エピトープを示し、該エピトープに対して抗体が生成される。T細胞の側にはTh細胞の特異性を図示しており、該Th細胞は種々のB細胞決定基に、抗体産生のための機能上の援助を及ぼすことができる。図示したすべてのTh-B細胞相互作用は実験的に実証されており、但し、S-特異的Th細胞の抗-pre-S (2) および抗-pre-S (1) 抗体

産生援助能並びにpre-S (2) -特異的Th細胞の抗-pre-S (1) 抗体産生援助能力は推定である。血清中を循環するビリオンおよびサブウイルス粒子の相対的濃度並びにウイルス複製中およびウイルス複製がない時の、様々な形態学的形状に関するpre-S抗原の特異な表示も図示されている。図の繰返しになるが、これらの観察は、HBsAg/P39でワクチン接種後またはHBVに感染した際に、抗-エンベロープ特異性の全てが生成されるかあるいは全く生成されないことを示唆している。一般に、これまでの臨床的観察はこの予測を支持している。Sおよびpre-S領域に特異的な抗体の産生は急性HBV感染の治療中にみられ、急性段階または慢性HBV感染中にはみられない。しかし、慢性的に感染されたHBV患者のサブセットは抗-pre-S (2) または抗-S抗体のない状態で抗-pre-S (1) のみを生成することが報告されており、これはHBsAgから抗-HBe状態およびウイルスクリアランスへの血清変換と相関している。同様に、ジリス肝炎ウイルスで慢性

感染した動物の一部が抗-pre-S (1) エンベロープ抗体のみを産生することを報告した。これらの観察は単に手にあるデータのみによって説明することはできない。また、ワクチン接種とは逆に、付随的因子が自然感染における抗体産生に影響を与えるかも知れないことを強調する。

ここに示したデータは、慢性感染への進行はT細胞レベルでのエンベロープ抗原に対する非応答性の結果であり、更に抗-pre-S (2) および抗-S産生のない場合の抗-pre-S (1) 産生はHBcAg/HBeAg決定基に特異的なTh細胞により媒介されることを示唆している。このことは抗-pre-S (1) 産生と抗-HBe血清変換との相関およびHBcAg/HBeAg-特異的T細胞が、上記のようにエンベロープ-特異的抗体産生を援助する能力と一致している。そこで生ずる問題は、なぜ抗-pre-S (1) のみが生成されるかに関するものである。なぜならば、HBcAg-特異的Th細胞も抗-Sおよび抗-pre-S (2) 抗体産生援助能力をもつからである。これは、スクレオカバ

シド抗原(HBcAg)の不足したサブウイルスの22nm球形粒子がHBV感染中完全なビリオンの大過剰のレベルで循環するという事実によって説明できる。この球形粒子はSおよびpre-S (2) 領域抗原両者を表現するが、pre-S (1) 領域抗原をまったく表現しないかあるいは極くわずかに表現するにすぎない(第15図参照)。従って、Sおよびpre-S (2) 領域決定基に特異的なB細胞はウイルスよりも一層球形粒子に結合し易く、かつHBcAg-特異的Th細胞から利益を得ることはないだろう。逆に、pre-S (1) -特異的B細胞は完全なビリオン上のそのリガンドをより一層良く識別する。というのはP39が優先的にウイルスと結合するからである。フィラメント状のサブウイルス粒子もP39を含むが、この形態学的形状は球形粒子と比較して血清中で支配的に存在しない(第15図参照)。

エンベロープ抗原に非応答性という状況において、HBV慢性感染はしばしば時間に伴って治療するという事実は、ウイルスクリアランスが真性

な過程であり、かつエンベロープ抗原に対するTh細胞応答の要求が回避できることを示唆する。多分、抗-pre-S抗体産生のみが細胞毎のウイルス感染性を中和するのに必要とされ、HBcAg/HBeAg-特異的Th細胞の機能はこの点に関してpre-S-特異的Th細胞と交替できる。同時に、HBcAg/HBeAgに特異的な細胞毒性Tリンパ細胞(CTL)応答性は他の者によって示唆されているように、ウイルス複製細胞を排除するのに必要とされる。B細胞同様にCTLがHBcAgとHBeAgとを識別するか否か、あるいはTh細胞同様に交叉反応的にHBcAgとHBeAgとを認識するかを決定することが残されている。

HBcAg/HBeAg-特異的Th細胞は、ウイルスを中和する抗-エンベロープ抗体を誘発できるという事実は、報告されたHBcAgワクチン接種のHBV感染防禦能力を説明できる。更に、HBcAg/HBeAg-特異的Th細胞は、ここで非応答性S領域において抗-S抗体産生を誘起することが示されたので、本研究ではHBsAg非応答を克服す

るもう一つの機序を記載する。唯一の要件はHBcAgとHBsAgとが分子間/構造内Th細胞機能を誘発し得るように作用可能に結合されていることである。

16. HBcAg-特異的ペプチドp120-140のT細胞識別の微視的特異性は応答する系のH-2ハプロタイプに依存する。

H-2^aおよびH-2^b系マウスのHBcAg-感作T細胞が排他的にHBcAgのp120-140配列を識別することを立証した。従って、各ハプロタイプがp120-140配列内の同一または異なるサイトを識別するか否かを決定することは興味がある。このために、N-末端(p120-131)、C-末端(p129-140)および重複ペプチド(p125-136)を合成した。各4匹のB10.S、B10またはB10.BRマウスからなる諸群を、その後足にCFA中の4.0 μgのHBcAgまたは100 μgの合成ペプチド：p120-140、p120-131またはp129-140のいずれかを投与して感作した。

感作8日後に、排出されるPLN細胞を収獲し、ブールし、かつ種々の濃度の(0.00015-16 μg/ml) HBcAg、p120-140、p120-131、p129-140、p125-135あるいは培地のみと共に培養し、T細胞感作を、実施例7に記載したようにT細胞増殖(T_p)により測定した。第16図(a)に示したように、B10.S(H-2^b)のHBcAg-感作T細胞はHBcAg、大きなペプチドp120-140およびN-末端ペプチドp120-131に応答して増殖したが、C-末端ペプチドp129-140には応答しなかった。ペプチドp125-136も活性であったが、120-131よりも著しく低いものであった(図示せず)。HBcAgまたは活性ペプチドで刺激されたHBcAg-感作T細胞の投与量-応答曲線は類似していたことに注意すべきである。尚、第16図のデータは抗原のない状態でのバックグラウンド増殖に対し補正したCPMで表わされている。バックグラウンド増殖は800~2000 CPMの範囲であった。

逆の実験ではペプチドで感作し、インビトロでHBcAgまたはペプチドで誘発した。B10.Sのp120-140-感作T細胞はHBcAg、免疫ペプチドp120-140、およびN-末端ペプチドp120-131を識別したがp129-140は認識しなかった(第16図(b))。従って、天然HBcAgで感作したT細胞と同様に、p120-140-感作T細胞はN-末端p120-131を認識した。同様に、p120-p131-感作T細胞はp120-140、p120-131およびHBcAgにより活性化された(第16図(c))。従って、12個の残基のペプチド、p120-131はインビボでHBcAg-特異的T細胞を感作するのに十分免疫抗原性であった。ペプチド感作T細胞は合成ペプチドの中のp120-131およびHBcAgに反応したが、合成ペプチドに対する応答がより効果的であり、このことは特にp120-131-感作T細胞について真であった(第16図(b)および(c))。これはB10.SのHBcAg-感作T細胞と逆であ

り、後者はHBcAgおよび活性ペプチドに等しく応答した(第16図(a))。c-末端ペプチド、p129-140はB10.S系においてわずかに免疫原性であった(第16図(d))。

同様な実験を、H-2コンジュニク(H-2^b)マウスで行った(第17図)。B10のHBcAg-感作T細胞はHBcAg、p120-140およびc-末端断片p129-140に感作して増殖したが、B10.SのHBcAg-感作T細胞と対照的に、p120-131またはp125-136には感作しなかった。p120-140配列はHBcAgおよびHBsAgに共通であるから、これらの結果はHBcAgとHBsAgとがT細胞増殖レベルで交叉反応性であることを予想している。バイオゲンSA(Biogen SA)(スイス国、ジュネーブ(Geneva, Switzerland))から入手した組換えHBsAgの利用により、この予想を確認できる。というのはB10のHBcAg-感作T細胞がHBsAgを識別するからである(第17図(a))。B10のp120-140またはp129-140

-感作T細胞はC-末端断片p129-140に特異的であり、かつ大体のところHBcAg並びに該免疫ペプチドを認識した(第17図(b), (d))。ペプチドp129-140-感作T細胞もHBsAgに感作して増殖した(第17図(d))。N-末端断片p120-131はB10系において非免疫原性であった(第17図(c))。同様な実験をB10.BR(H-2^b)マウスで行ったところ、B10.BRのHBcAg-感作T細胞はHBcAgおよびHBsAgを識別したが、p120-140配列および線形のペプチドは刺激性でも免疫原性でもなかった(図示せず)。

尚、第17図のデータは、各4匹のB10マウスからなる群に、その後足からCFA中の(a)4.6μgのHBcAg、(b)100μgの合成ペプチドp120-140、(c)p120-131または(d)p129-140を投与して免疫し、8日後に脾臓P.L.N細胞を収獲し、ブールし、かつ図示した濃度(0.00015~16μg/ml)のHBcAg、HBsAg、p120-140、p120-131、

p129-140または培地のみと共に培養し、T細胞増殖を第16図について記載のように測定して得た。

17. 合成ペプチドp120-140、p120-131およびp129-140はインビボで機能性ヘルパーT細胞活性を感作し得る。

HBcAgのT細胞識別の微視的特異性を調べるもう一つの方法としてかつ合成T細胞刺激ポリペプチドのインビボでの抗体産生を感作する能力を測定する手段として、ヘルパーT細胞アッセイを行った。ヘルパーT細胞活性は、各4匹のB10.S、B10、またはB10.BRマウスからなる群を、CFA中の100μgのHBcAg-特異的ペプチド、即ちp120-140、p120-131またはp129-140で感作(1^{*})し、かつ21日経過後に不完全アジュバント中のHBcAgの準最適量(0.1μg)で誘発(2^{*})することにより測定した。誘発から7日後に、血清抗-HBc抗体を、ミリッヒ(Milich)等の論文(ジャーナル オブ イムノロジー(J. Immunol.)),

1982, 129, 320-325)に記載の固相RIAにより測定した。

簡単にいえば、ブールしたネズミ血清を、間接固相RIAで抗体につき評価した。該RIAでは固相HBcAg(0.1μg/ウエル)、HBsAg/GP33(0.1μg/ウエル)または合成ペプチド(1~2μg/ウエル)並びに二次抗体として山羊抗-マウスIgGを用いた。また、¹²⁵I-標識、アフィニティー精製豚抗-山羊Igで現像した。約35%のGP33を含む組換えHBsAg粒子をP. チオレ(P. Tiollais)(パスツール インスティテュート パリ フランス(Pasteur Institute, Paris, France))から入手し、ここではHBsAg/GP33と呼ぶ。結果は、免疫前の血清の計数値の4倍の値とするに要する最大希釈率を表す抗体力価として表した。

CFAのみで感作し、かつHBcAgで誘発したマウスあるいはHBcAgによる誘発なしにペプチドで感作したマウスをコントロール(O)とした。第18図に示したように、合成T細胞サイト、

p120-140、p120-131、および p129-140で感作することにより、B10.S系マウスでは抗-HBc抗体産生は誘起されず、またp129-140はB10系マウス中にほんのわずかに抗-HBcを誘発するにすぎなかった。従って、これらのペプチドはT細胞識別サイトを含有し、該ペプチド上に存在するB細胞エпитロープは活性HBcAgには無関係であり、あるいはこれに曝露されていない。即ち、これらはペプチドに特異的である。従って、これらペプチドのインビボでの直接的Th細胞感作能を調べる事が可能であった。これはT細胞転移実験を行うのとは逆である。この方法では、ペプチドでの免疫により感作された記憶T細胞がHBcAgによる誘発で呼出される必要があり、これは合成T細胞認識サイトと天然分子との関連性を示している。

B10.S系において、未感作マウスをHBcAgで誘発すると、最小量のインビボでの抗-HBc (1:40) 産生を示すが、p120-140-感作マウスをHBcAgで誘発すると、該誘発後7

日目に、IgG、抗-HBcを効率的に産生する (1:5120)。第18図の上図参照。T細胞活性の微視的特異性を調べるために、B10.S系マウスをN-およびC-末端をもつペプチドで感作し、次いでHBcAgで誘発した。N-末端をもつペプチド、即ちp120-131で感作すると、著しい抗-HBc産生 (未感作マウスの256倍) を示し、一方C-末端をもつペプチドはほんのわずかに反応性 (未感作の4倍) を示すにすぎなかった (第18図)。同様に、p120-140での免疫はB10系マウスに抗-HBc産生を感作した (1:10,240)。しかし、B10.S系マウスとは対照的に、C-末端をもつペプチド、p129-140はB10系マウスにおいて抗-HBc産生を感作し、かつN-末端をもつペプチドは不活性であった (第18図の下図)。HBcAgのp120-140配列はB10.BR系マウスに抗-HBc産生を感作しなかった (図示せず)。これら結果はT細胞増殖の結果と一致しており、しかもTpとTh細胞の微視的特異性間の一致を示す。

18. HBcAg-特異的ペプチド、p120-140は、HBVエンベロープからの合成B細胞エイトープに対するT細胞阻体部分として機能できる。p120-140配列は、インビボで抗-HBc産生を誘発し得るB10.SおよびB10系マウスに対する別々のTh細胞認識サイトを包含することが示されたので、ペプチドp120-140を直接合成B細胞エイトープに結合して、その該エイトープに対するT細胞阻体として機能する能力を調べた。選ばれたB細胞エイトープはpre-S (2) 領域ペプチド、p133-140 (DPRVRLY) であり、これは前にHBsAg/GP33粒子のpre-S (2) 領域内の支配的抗体結合サイトを表すものであることが示されたものであった。このpre-S (2) 領域の複合化されていないp133-140配列はB10.S、B10およびB10.BR系においては非免疫原性である (データは図示せず)。各5匹のB10.S、B10およびB10.BR系マウスからなる群を、CFA中の100μgの複合蛋白で免疫した。該複合蛋白はHBcAg配列から

の残基120-140と該エンベロープのpre-S (2) 領域からの残基133-140とを含み、この複合ポリペプチド免疫原はc120-140-(133-140)と名付けた。これらマウスを、4週間経過後に、不完全アジュバント中の該複合ペプチド50μgで追加刺激した。血清は免疫前、一次免疫 (1°) から3週間後、および二次免疫 (2°) から2週間後に集め、これらを実施例17に記載のような固相RIA法により、T細胞阻体ペプチド、c120-140、HBcAg粒子、B細胞エイトープ (133-140)、およびHBsAg/GP133エンベロープ粒子に対して特異的なIgGクラスの抗体につき分析した。結果を第5表に示す。

第 5 表:

HBcAg-特異的p120-140配列は、合成pre-S(2)領域B細胞エпитープ(133-140)に対するT細胞担体として機能し得る。

| マウス系 | 免疫原 ^a | 時間 | 抗体価 (1/希釈率) ^b | | | |
|--------|--------------------|-----|--------------------------|-----------------|------------|--------|
| | | | c120-140 | HBcAg (133-140) | HBsAg/GP33 | |
| B10.S | c120-140-(133-140) | Pre | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 1* | 10,240 | 0 | 640 | 1,280 |
| | | 2* | 40,960 | 1,280 | 10,240 | 10,240 |
| B10 | c120-140-(133-140) | Pre | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 1* | 1,280 | 0 | 0 | 0 |
| | | 2* | 81,920 | 5,120 | 2,560 | 1,280 |
| B10.BR | c120-140-(133-140) | Pre | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 1* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 2* | 0 | 0 | 0 | 0 |

大した。二次抗-c120-140抗体はほんのわずかにHBcAg蛋白と反応性であるにすぎないが、抗-(133-140)抗体は天然のHBsAg/GP33蛋白と著しく交叉反応性であった。B10系マウスはB10.S系マウスよりもc120-140-(133-140)免疫に対し低い反応性であった。即ち、これは抗-(133-140)抗体産生を誘発するのに二次免疫が必要であることにより証明され、B10.S系の二次応答と比較して4~8倍低かった(第5表)。B10.S系マウスと同様に、B10の抗-(133-140)抗体は天然のHBsAg/GP33に対し著しく交叉反応性であるが、抗-c120-140はほんのわずかに天然HBcAgと交叉反応性であるにすぎなかった。B10.SおよびB10系は、c120-140配列に対する高力価の支配的なペプチド-特異的抗体を生成した。これら両系において、抗体はC-末端をもつ断片、p129-140に対して特異的であった(データは示さず)。T細胞増殖およびTh細胞の実験から予想されるように、

1: 表1に示したマウス系はCFA中の100μgのc120-140-(133-140)でi.p.経路で免疫し、4週間後に不完全アジュバント中の50μgでi.p.経路で二次免疫した。血清は免疫前(Pre)、一次免疫(1*)から3週間後、および二次免疫(2*)から2週間後に集めた。

2: 表に示した抗原に特異的な抗体(IgG)は、固相RIA法で測定し、かつ免疫前の血清の計数値の4×の値とするに必要な希釈率の逆数で表した。

c120-140-(133-140)で一次免疫後、B10.S系マウスはHBcAg特異的のペプチド(c120-140)(これは天然のHBcAgと交叉反応しなかった、即ちペプチド特異的であった)に対する抗体および天然のHBsAg/GP33粒子と交叉反応するpre-S(2)領域ペプチド(133-140)に対する抗体を生成した。二次免疫後、すべての抗体力価は4倍(抗-c120-140)~16倍(抗-133-140)に増

B10.BR系マウスはc120-140-(133-140)による免疫に反応しなかった。これらの結果はHBcAg-特異的の合成ペプチドp120-140が、合成B細胞エпитープに対するT細胞担体として機能できることを示しており、該エピトープはT細胞レベルでHBcAgの120-140配列を認識する系におけるHBVのエンベロープに表現される。

19. 合成免疫原、c120-140-(133-140)のT細胞認識の微視的特異性

複合免疫原内の予想されたサイトがT細胞認識サイトとして機能するか否かを確認するために、c120-140-(133-140)免疫マウスをT細胞レベルで評価した。各4匹のB10.S、B10およびB10.BR系マウスからなる群を、その後足にCFA中の100μgのc120-140-(133-140)を投与して免疫し、排出されるPLN細胞を8日後に収穫した。複合ペプチドで感作したT細胞を、種々の濃度のHBcAg、HBsAg/GP33、HBcAg-特異

的ペプチド: p 120-140, p 120-131, p 129-140; および pre-S (2) 領域ペプチド (133-140) と共に培養し、T細胞増殖を調べた。1.0 μ g/ml の抗原により誘発される T細胞増殖の程度は第19図に示した。B10.S の c 120-140-(133-140)-感作 T細胞は c 120-140、N-末端をもつ断片、p 120-131、および天然 HBcAg に応答した。B細胞エビトープ (133-140) および天然 HBsAg/GP33 粒子はすべての濃度において非刺激性であった (第19図上図)。B10 の c 120-140-(133-140)-感作 T細胞は c 120-140、C-末端をもつ断片: p 129-140、および天然 HBcAg により活性化された。B細胞エビトープ (133-140) および天然 HBsAg/GP33 はすべての濃度において非刺激性であった (第19図中央の図)。B10系に比較して、B10.S系の著しく高いペプチド-特異的 T細胞増殖応答性は、c 120-140-(133-140) による免疫後の

B10.S系にみられたより高い抗-pre-S (2) 抗体産生 (第5表) を説明できる。B10.BR の c 120-140-(133-140)-感作 T細胞は全抗原サンプルに対して非応答性である (第19図下図)。これらの結果および第5表に示した抗体の結果は、複合ペプチドの T細胞認識は H-2 依存性であり、かつ Tp および Th 活性に関して遊離 p 120-140 にみられた特異性パターンと相関していることを示す。尚、上記 T細胞増殖応答は第1図の場合と同様に測定し、増殖のバックグラウンドは 500-1500 CPM であった。

上記記載 (特定の態様および実施例を含む) は本発明を例示するものであり、限定するためのものではない。多数の他の変更並びに改良が本発明の真の精神並びに範囲から逸脱することなしに得る。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、HBV サブタイプ ayw のコア蛋白の、左から右にかつアミノ末端からカルボキシ末端の

方向に見て、しかも単一文字アミノ酸残基コードを用いて表したアミノ酸残基配列を示す図であり、

第2図は第1図と同じ配向かつ単一文字アミノ酸残基コードを用いて表示した、HBV の6種のサブタイプをもつ HBsAg の pre-S (2) 領域のアミノ酸残基配列を示す図であり、

第3図は、パセック (Pasek) 等 (ネイチャー (Nature), 1979, 282: 575) により核酸配列から翻訳されたような、HBV ayw サブタイプ HBsAg/ayw 蛋白からの S の 226 アミノ酸配列を第1図同様の配向並びに単一文字アミノ酸残基コードを用いて示した図であり、

第4図は粒状コア蛋白が T細胞-独立抗原として機能し得ることを示す図であり、

第5図は HBcAg が効果的に T細胞を刺激することを示す図であり、

第6図は HBcAg-特異的 T細胞増殖応答に対する免疫化用量の作用を示す図であり、

第7図は、抗-HBcAg 抗体産生が先行しかつ胸腺機能正常 Balb/c マウスにおける抗-HBsAg

の産生よりもずっと大きいことを示す図であり、

第8図は HBcAg および HBeAg が T細胞レベルで交叉反応性であることを示す図であり、

第9図 (第9A図および第9B図) は、合成ペプチドを用いた HBcAg/HBeAg 配列内の T細胞サイトの位置を示す図であり、

第10図 (a) および (b) は B10.S系における HBcAg-特異的 T細胞増殖応答を誘起および誘発する合成ペプチド p 120-140 の能力を示す図であり、

第11図 (a) および (b) は第10図に記載のものと同一であるが B10 マウス系を用いた研究の結果を示す図であり、

第12図 (a), (b) および (c) は Cs. H. Q 系における HBcAg-特異的 T細胞増殖応答の誘起、誘発両者に対するペプチド断片 p 100-120 および p 1-20 の能力を示す図であり、

第13図 (a) および (b) は B10.D2 系における HBcAg-特異的 T細胞増殖応答の誘起、誘発に対するペプチド断片 p 85-100 の

能力を示す図であり、

第14図は、B10.SマウスのHBcAg-誘発およびp120-140-誘発Th細胞がHBVのエンベロープのS、pre-S(2)およびpre-S(1)領域に特異的な抗体産生を誘起し得ることを示す図であり、

第15図は肝炎Bウイルスおよびサブウイルス粒子(球、フィラメント)に対する免疫応答を調節するTヘルパー細胞-B細胞相互作用の模式的表示であり、

第16図はB10.S(H-2^b)系におけるHBcAgのT細胞認識の特異性を示す図であり、

第17図はB10(H-2^b)系におけるHBcAgのT細胞認識の特異性を示す図であり、

第18図はp120-140、p120-131およびp129-140によって表わされるHBcAgの合成T細胞サイトが生体内に抗-HBc産生を誘起するTh細胞を誘発できることを示す図であり、および

第19図はB10.S、B10およびB10.BR

系における、合成免疫原c120-140-

(133-140)のT細胞認識の特異性を示す図である。

図面の浄書(内容に変更なし)

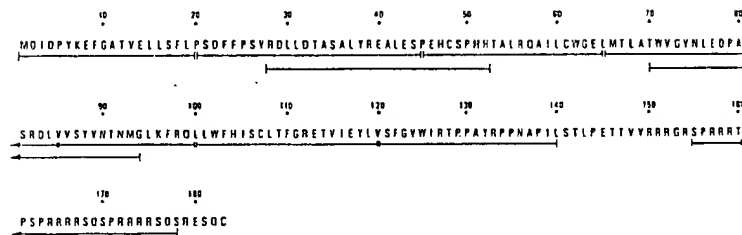


FIG. 1

FIG. 2

PRE-S ホリペプチド

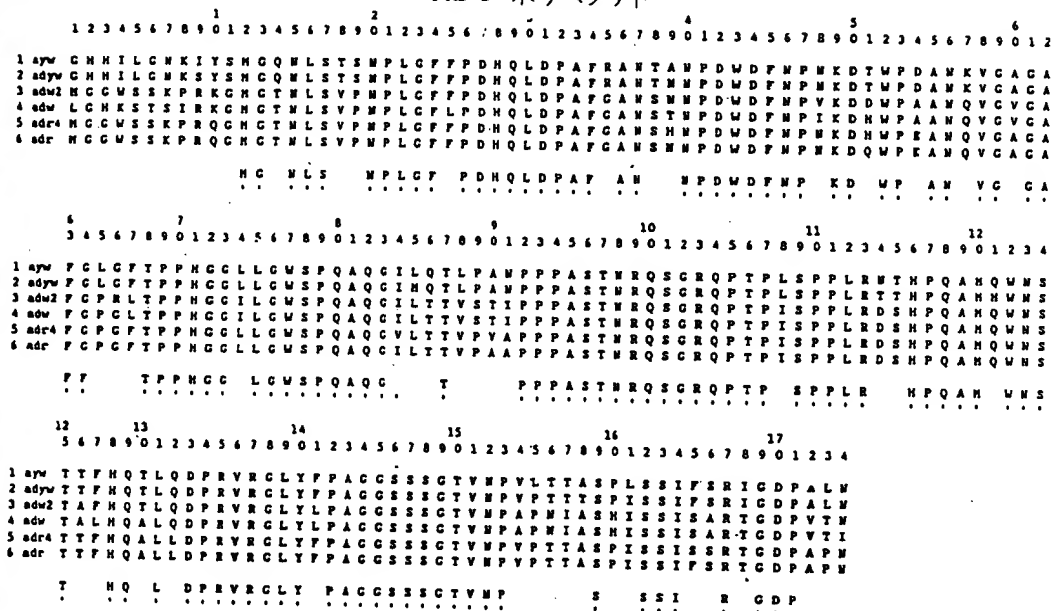


FIG. 3

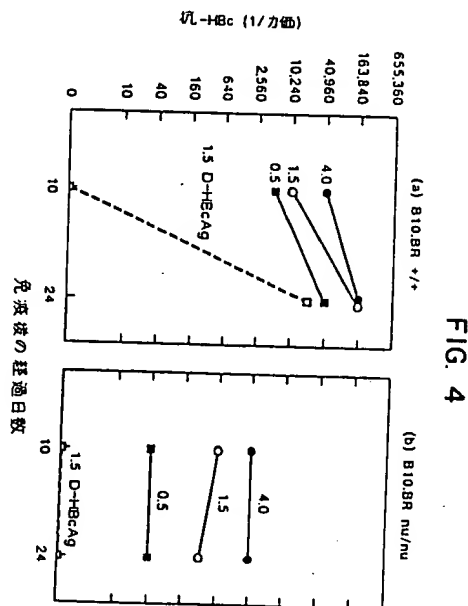
[illegible]

FIG. 6

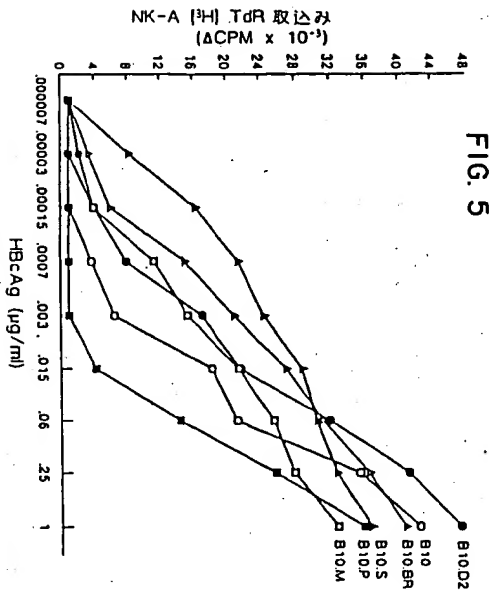
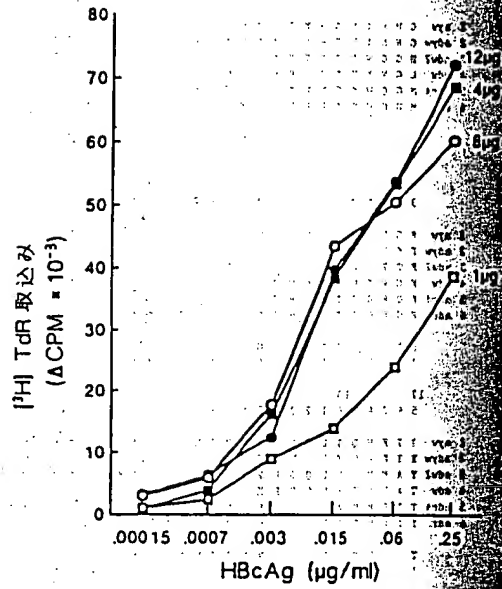


FIG. 5

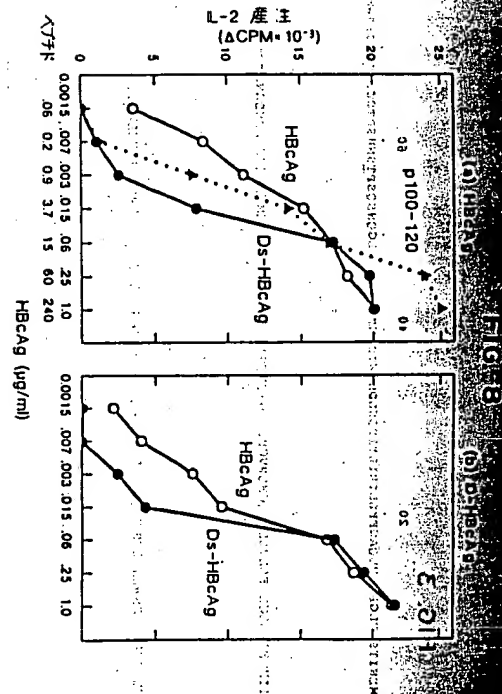
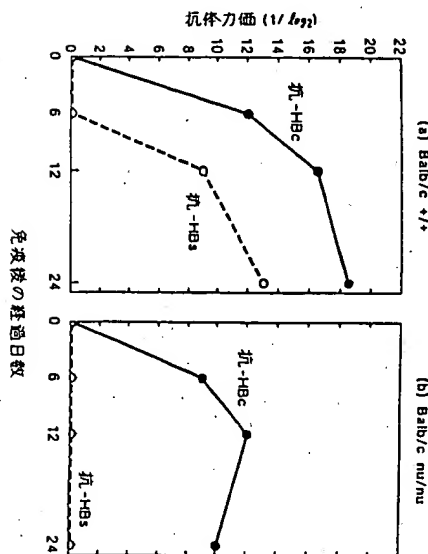
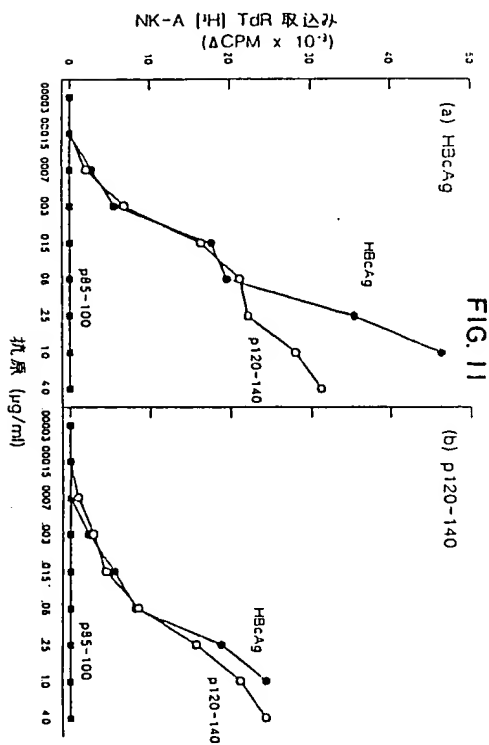
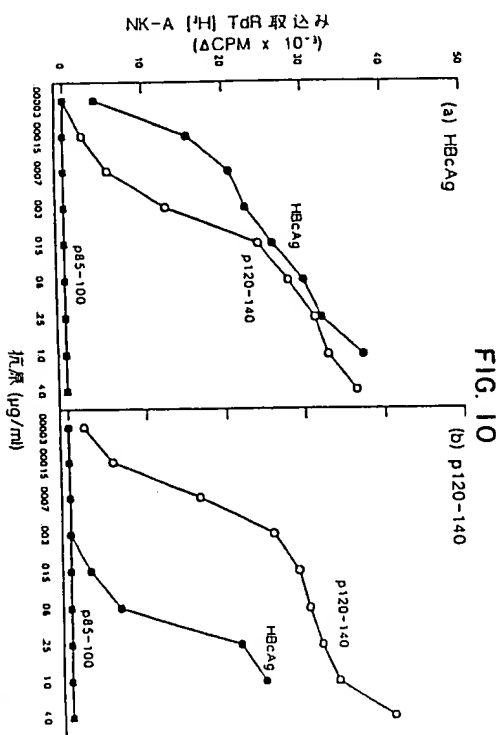
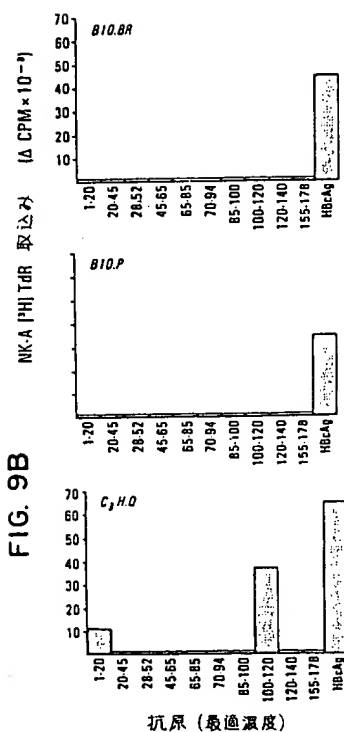
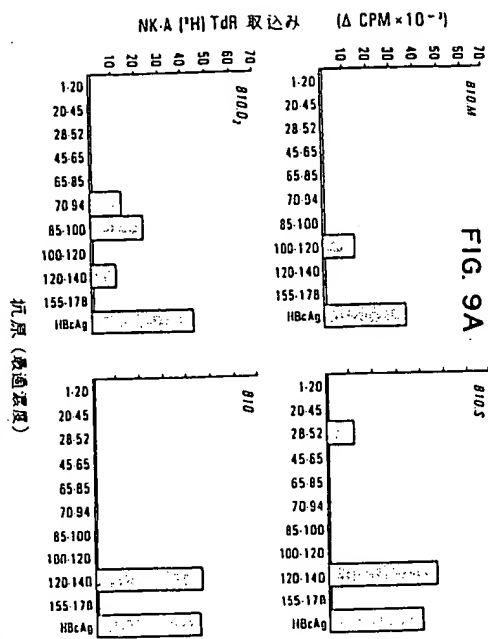


FIG. 8

FIG. 7





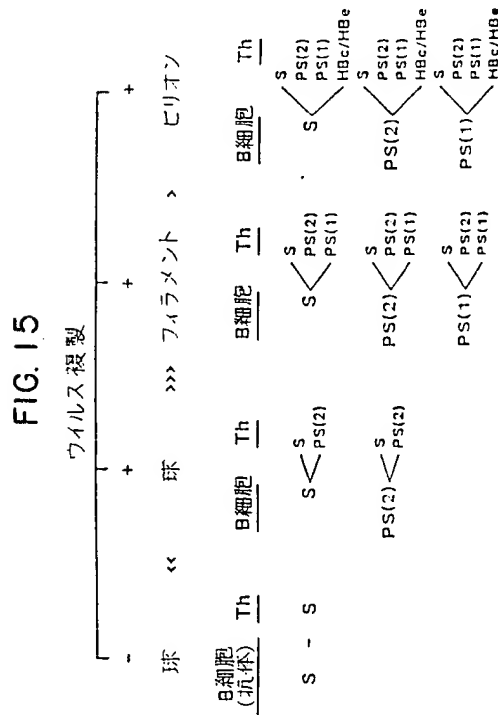
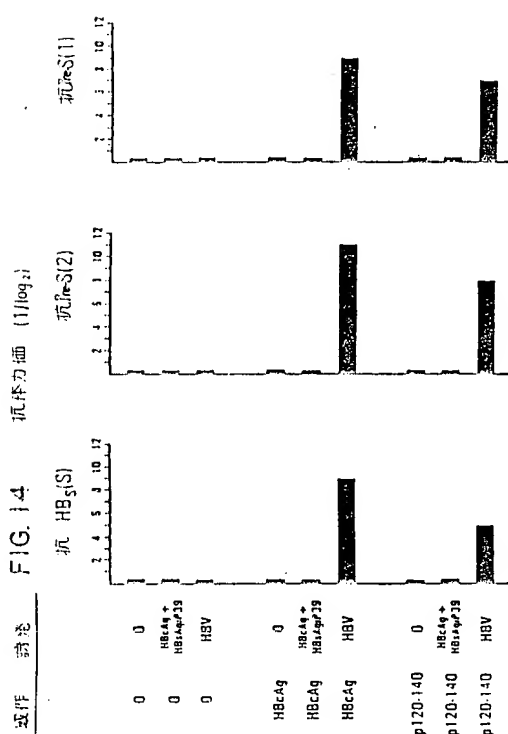
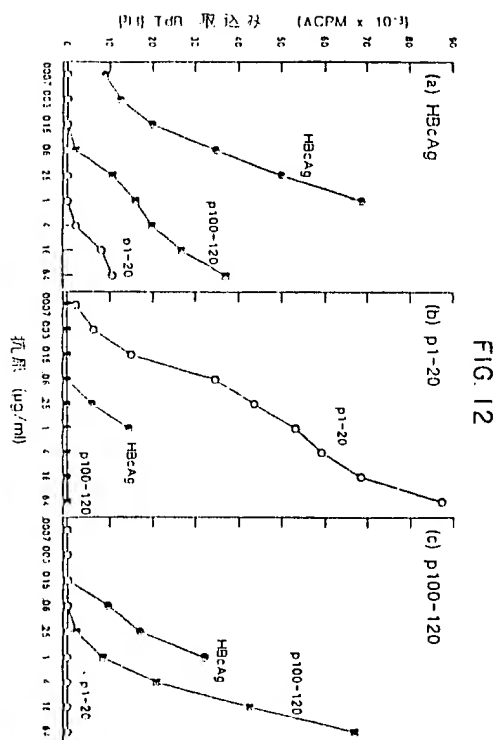
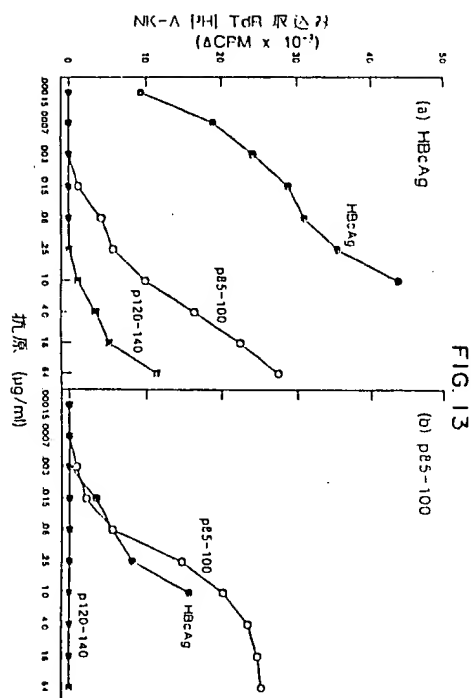


FIG. 16

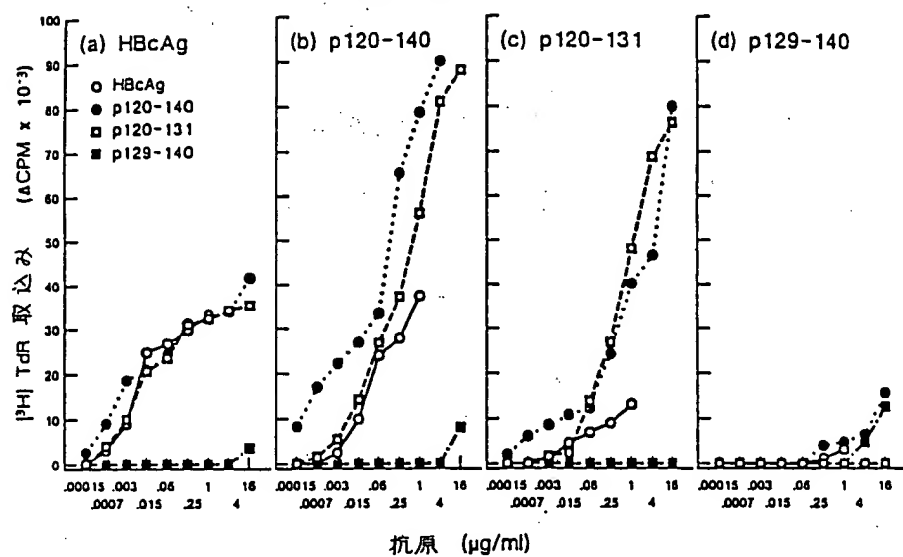


FIG. 17

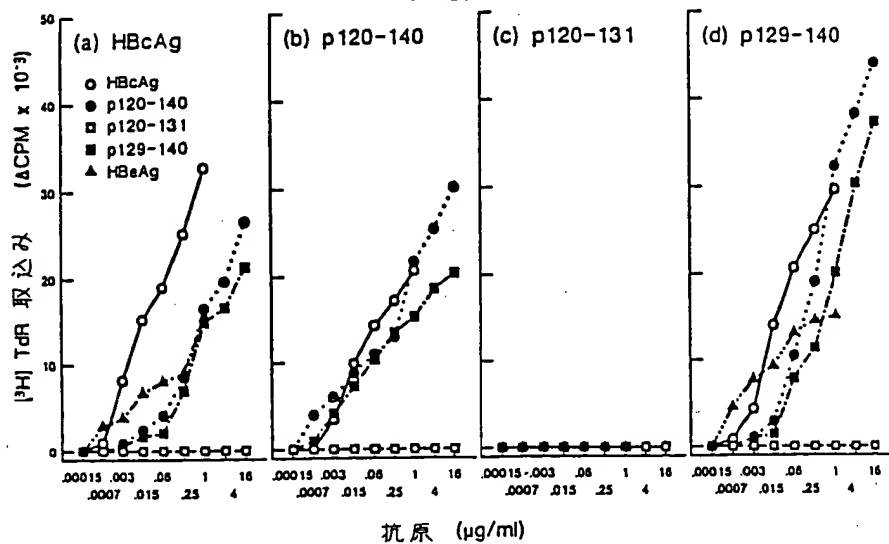


FIG. 18

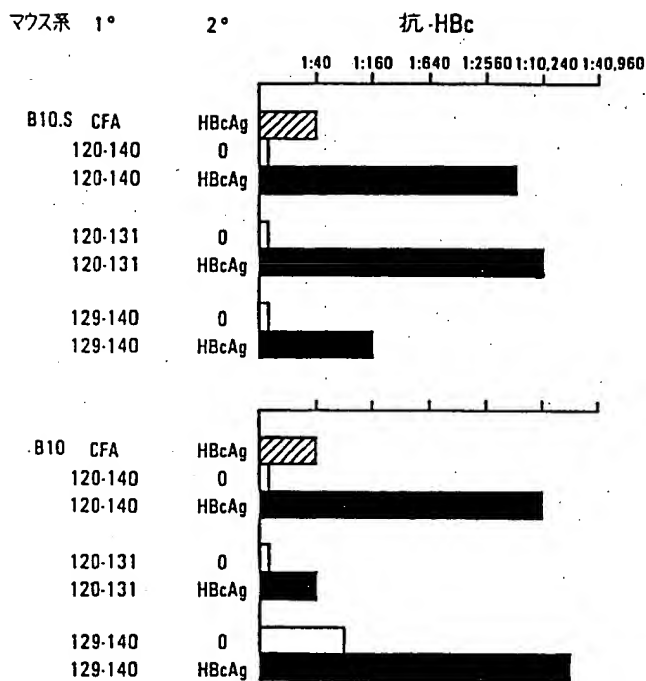
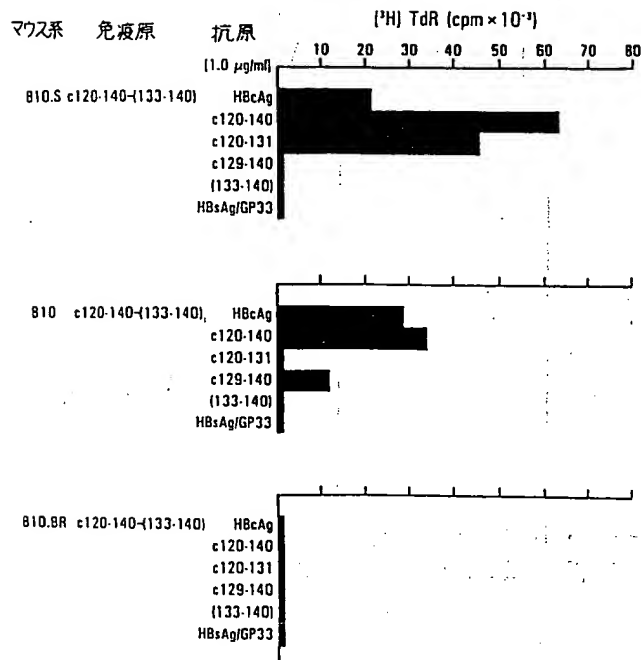


FIG. 19



第1頁の続き

⑤Int.Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号
C 07 K 7/10 8318-4H
13/00 8318-4H
// C 12 P 21/00 D-6712-4B
C 07 K 99:00

優先権主張 ⑫1987年10月7日⑬米国(US)⑭106538
⑯発明者 デイヴィッド アール アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92126 サン デイ
ミリック エゴ ポラリス ドライヴ 11591
⑰発明者 アレン マッククロラ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92130 サン デイ
ン エゴ モンテラノ テラス 12591

手続補正書(方式)

昭和 年 63.9.-2 日

特許庁長官 吉田文毅殿

1.事件の表示 昭和62年特許願第311803号

2.発明の名称 肝炎Bウィルススクレオキ+ブシド
蛋白のT細胞エビトープ

3.補正をする者

事件との関係 出願人

名称 スクリップス クリニック アンド
リサーチ ファウンデーション

4.代理人

住所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号
電話(代)211-8741

氏名(5995)弁理士 中村 健

5.補正命令の日付 昭和63年2月23日

6.補正の対象

願書の特許出願人の欄、
代理権を証明する書面、
明細書、全図面、
明細書の簡単な説明の欄

7.補正の内容

(1) 願書に最初に添付した図面の浄書・別紙のと
おり(内容に変更なし)

(2) 明細書の第122頁第7行、第11行及び第
18行の“(a)および(b)”をそれぞれ削除す
る。

(3) 同書の第122頁第14行の“(a)および(b)”
を“(a)、(b)および(c)”に訂正する。

(4) その他別紙のとおり

63.9.3

方式
手続